

Margarida Caeiro de Jesus Caras Altas

**Resolução Cinética Enzimática de Álcoois Secundários
em Água por Tecnologia de Miniemulsões**

**Lisboa
2010**

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química

Resolução Cinética Enzimática de Álcoois Secundários em Água por Tecnologia de Miniemulsões

Por

Margarida Caeiro de Jesus Caras Altas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
para a obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador:

Doutor Nuno Miguel Torres Lourenço

Co-orientador:

Professor Doutor Frederico Castelo Alves Ferreira

Lisboa
2010

Aos meus queridos pais, irmão e amigos,
por estarem presentes em todos
os momentos da minha vida.

Agradecimentos

O trabalho desenvolvido durante este ano teve um contributo essencial do grupo científico com quem trabalhei, a constante entreaajuda e disponibilidade demonstrada foram fundamentais para a elaboração desta dissertação.

Dessa forma, gostava de expressar um especial agradecimento ao Dr. Nuno Lourenço, o orientador científico desta dissertação, pelo contributo essencial que depositou na elaboração da dissertação, nomeadamente através do apoio que disponibilizou de uma forma constante e empenhada e através do elevado contributo científico prestado na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Frederico Ferreira, o co-orientador desta dissertação, quero agradecer a forma como sempre se disponibilizou a ajudar e de uma forma mais constante na parte final da dissertação.

Ao Prof. Doutor Luís Fonseca, um agradecimento especial por me ter acolhido no seu laboratório, no Instituto Superior Técnico, e pela sua ajuda sempre que foi necessária.

Agradeço também, em particular, a contínua disponibilidade para ajudar e a paciência demonstrada por parte da Dr^a. Carla de Carvalho, do Dr. Pedro Fernandes, do Dr. Marco Marques

Um agradecimento também especial à Dr^a. Dragana Barros pela sua ajuda incondicional, principalmente no trabalho com o cromatógrafo gasoso.

A todos os meus colegas de laboratório Manuela Frasco, António Castro, Johannes Osterreicher, Sara Badenes, Carlos Rodrigues, Sofia Rebelo e Irina Pinheiro, agradeço o apoio incondicional demonstrado e todos os momentos de boa disposição e de cumplicidade que passámos juntos.

Sumário

A síntese de compostos enantiomericamente puros tem sido uma das principais áreas de interesse da indústria farmacêutica, onde uma das técnicas mais utilizadas na obtenção deste tipo de compostos é a resolução cinética enzimática (RCE). A utilização de enzimas apresenta algumas vantagens relativamente aos catalisadores químicos, na medida em que, permite uma maior velocidade de reacção, melhora a eficiência da reacção e aumenta também a selectividade da reacção. Ambientalmente, as enzimas tornam o processo mais verde e menos perigoso.

O objectivo principal deste trabalho é estudar a viabilidade do desenvolvimento de um processo de RCE de álcoois secundários em água por tecnologia de miniemulsões. A grande vantagem da utilização de miniemulsões directas na RCE de álcoois secundários, através de reacções de esterificação, prende-se com o facto de neste processo a água formada ser absorvida pelo meio reaccional, água. O segundo objectivo é testar uma nova classe de compostos (agentes acilantes surfactantes iónicos (AASIs)), que tendo uma cadeia ácida apolar e um grupo polar combinam na mesma molécula as propriedades de acilante e surfactante, para a formação de miniemulsões e aplicação na RCE de álcoois secundários. O terceiro objectivo é a separação de ambos os enantiómeros de uma mistura racémica após a RCE.

A utilização dos AASIs torna este processo bastante inovador porque estes agentes permitem também uma mais fácil separação dos dois enantiómeros, visto que quando se desestabiliza as miniemulsões, o enantiómero que não reage forma uma segunda fase, enquanto o enantiómero que se liga ao AASI fica na fase aquosa devido ao seu carácter iónico. Este processo pretende ultrapassar as limitações presentes aquando da utilização de tecnologias convencionais, tornando-se um processo mais sustentável, mais eficiente e mais limpo.

Numa primeira fase, calculámos as concentrações micelares críticas (CMCs) dos diferentes AASIs, para garantir que estamos a trabalhar numa concentração que permita a formação de miniemulsões.

Numa segunda fase, com o intuito de estudar estes AASIs na RCE de álcoois secundários, procedemos a reacções de esterificação em que foram utilizados como substrato modelo o 1-feniletanol e como agentes acilantes, o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio e o tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-

metil-imidazólio. Neste estudo, embora tenhamos utilizado concentrações de AASI acima da CMC, não conseguimos obter resultados satisfatórios em termos de excesso enantiomérico (ee) para a RCE de álcoois secundários. Para justificar estes resultados, colocámos a hipótese dos AASIs apresentarem um carácter diiónico, em que o grupo acilante poderá funcionar também como surfactante, influenciando a estabilidade das miniemulsões. Para eliminar este carácter diiónico, decidimos proceder a reacções de transesterificação dos ISAAs, brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio, tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio, hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio e dioctil sulfossuccinato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio. Este estudo revelou que existe RCE do 1-feniletanol, apresentando um ee máximo de 14%.

Numa terceira fase, no sentido de obter uma RCE mais eficaz, procedemos a uma reacção de esterificação do 1-feniletanol, utilizando um agente acilante mais polar, o ácido octanóico, e como agente surfactante, o lutensol. O ee foi mais elevado (ee≈40%), sugerindo que o ácido octanóico permite a formação de emulsões mais estáveis ao longo do tempo do que a utilização de AASIs. Nesta fase, foi efectuado um estudo da influência da concentração de enzima, em que se utilizaram diferentes quantidades de Lipase PS “Amano”, não existindo variações significativas dos valores de ee obtidos.

Numa última fase, aplicámos o mesmo sistema de agente acilante e surfactante, ácido octanóico e lutensol, respectivamente, a um substrato modelo com elevado interesse comercial: o sulcatol (6-metil-5-hepten-2-ol). E, efectuámos também um estudo da influência da concentração de enzima, em que se utilizaram diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” e verificámos que existem variações significativas do ee, apresentando para a maior quantidade de enzima (60mg) os valores mais elevados de ee. Obtivemos um valor máximo de ee de aproximadamente 77% para este álcool, utilizando 60mg de Lipase PS “Amano”, que foi superior ao valor obtido para o 1-feniletanol, aproximadamente 40%. Evidenciando que, o 1-feniletanol contrariamente ao sulcatol poderá interferir na estabilidade das miniemulsões.

Determinámos também para o sulcatol uma conversão de 35%, um ee de substrato de 47%, um ee de produto de 90% e uma razão enantiomérica de 30. Foi assim possível uma eficiente RCE deste álcool e portanto uma boa enantioselectividade desta reacção.

Abstract

Nowadays, the enantiomeric compounds synthesis has been one of the main interest areas of the pharmaceutical industry, where one of the most used techniques to obtain of these compounds is the enzymatic kinetic resolution (EKR). The use of enzymes has some advantages relatively to chemical catalysts, such as, allows a better reaction rate, improves the efficiency of the reaction and also increases the selectivity of the reaction. Environmentally, the enzymes make the process greenest and less dangerous.

The main objective of this work is to study the feasibility of developing a process of EKR of secondary alcohols in water by miniemulsions technology. The big advantage of using the direct miniemulsions in the EKR of secondary alcohols, via esterification reactions, is related with the fact that in this process the formed water is absorbed by the reaction medium, water. The second objective is to test a new class of compounds (ionic surfactant acylating agents (ISAAs)) which have an acidic apolar chain and a polar group, so they combine the properties of acylating and surfactant for the miniemulsions formation and application in the EKR of secondary alcohols. The third objective is the separation of both of enantiomers of a racemic mixture after EKR.

The use of ISAAs make this process quite innovative because these agents also allow an easier separation of the two enantiomers, for when there is the miniemulsions desestabilization, the enantiomer that doesn't react forms a second phase, while the enantiomer that binds to ISAA remains in the aqueous phase because of its ionic character. This process aims to overcome the present limitations when we use conventional technologies, making it a more sustainable, more efficient and cleaner.

In a first phase, we calculated the critical micellar concentrations (CMCs) of different ISAAs, to ensure that we are working in a concentration that allows the formation of miniemulsions.

In a second phase, with the aim to study these ISAAs in the EKR of secondary alcohols, we made esterification reactions in which 1-phenylethanol was used as model substrate, and 1-(10-carboxy-decan-1-il)-3-methyl-imidazolium bromide and 1-(10-carboxy-decan-1-il)-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate were used as acylating agents. Although we had used concentrations of ISAA above the CMC, we couldn't obtain satisfactory results in terms of enantiomeric excess (ee) for the EKR of

secondary alcohols. To justify these results, we put the hypothesis of the ISAAs have a diionic character, in which the acylating group may also function as a surfactant, influencing the stability of miniemulsions. To eliminate this diionic character, we decided to make transesterification reactions, where we used 1-(10-carboxy-decan-1-yl)-3-methyl-imidazolium bromide, 1-(10-carboxy-decan-1-yl)-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate, 1-(11-ethoxy-11-oxoundec-1-yl)-3-methyl-imidazolium bromide, 1-(11-ethoxy-11-oxoundec-1-yl)-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate, 1-(11-ethoxy-11-oxoundec-1-yl)-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate and 1-(11-ethoxy-11-oxoundec-1-yl)-3-methyl-imidazolium dioctyl sulfosuccinate. This study showed us that the EKR of 1-phenylethanol can occur, where we obtained a value of maximum ee of 14%.

In a third phase, with the aim to achieve a more efficient EKR, we made a esterification reaction of the 1-phenylethanol, and we used an acylating agent more polar, the octanoic acid, and as a surfactant agent, the lutensol. The ee was higher (ee \approx 40%), suggesting that the octanoic acid allows the formation of more stable emulsions over the time than the use of ISAAs. At this phase, it was made a study about the influence of enzyme concentration, in which different quantities of the Lipase PS “Amano” were used, with no significant variations in the values of ee obtained.

In a last phase, we applied the same system of acylating agent and surfactant, octanoic acid and lutensol, respectively, to one model substrate with high commercial interest: the sulcatol (6-methyl-5-hepten-2-ol). And, we also made a study about the influence of enzyme concentration, in which different quantities of Lipase PS “Amano” were used, and we verified that there are significant variations in the values of ee, more precisely we obtained for the highest amount quantity (60mg) of the enzyme the highest values of ee. We obtained a maximum value of ee for this alcohol about 77% when we used 60mg of Lipase PS “Amano” that it was superior to the obtained value for 1-phenylethanol (\approx 40%). Showing that, in the opposite of sulcatol the 1-phenylethanol can interfere in the stability of the miniemulsions.

We also determined for sulcatol a conversion value of 35%, a substrate enantiomeric excess value of 47%, a product enantiomeric excess value of 90% and an enantiomeric ratio value of 30. Thus, it was possible obtain an EKR of this alcohol and therefore a good enantioselectivity of this reaction.

Abreviaturas

AASI	Agente Acilante Surfactante Iónico
AOT	Dioctil sulfosuccinato de sódio
a_w	Actividade da água
BF_4	Tetrafluoroborato
Br	Bromo
c	Conversão da reacção
cm	Centímetro(s)
CALA	Lipase A de <i>Candida antartica</i>
CALB	Lipase B de <i>Candida antartica</i>
CMC	Concentração Micelar Crítica
CpyrB	Brometo de cetiltrimetilpiridina
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
E	Razão enantiomérica
ee	Excesso enantiomérico
eep	Excesso enantiomérico do produto
ees	Excesso enantiomérico do substrato
eq.	Equivalente
GC	Cromatografia Gasosa
h	Hora(s)
H_3PO_4	Ácido fosfórico
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de protão
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
k_R	Constante de velocidade do enantiómero R
k_S	Constante de velocidade do enantiómero S
k_{rac}	Constante de racemização
LI	Líquido Iónico
mg	Miligramma(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mmol	Milimole(s) (10^{-3} mole)
μm	Micrómetro(s)
MTBE	Éter metil <i>terc</i> -butílico
NaCl	Cloreto de sódio
NaSO_4	Sulfato de sódio
NEA	Nitrato de etilamónia
PS “Amano”	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
PF_6	Hexafluorofosfato
s	Segundo(s)
<i>rac</i>	Racémico
RCD	Resolução Cinética Dinâmica
RCE	Resolução Cinética Enzimática
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
δ	Desvio químico
% (p/p)	Percentagem peso por peso
% (p/v)	Percentagem peso por volume
% (v/v)	Percentagem volume por volume

Índice de Matérias

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Resolução Cinética	1
1.2 Resolução Cinética Dinâmica	3
1.3 Enzimas	4
1.3.1 Lipases	6
1.3.2 CALB (Lipase B de <i>Candida antarctica</i>)- Estrutura e Origem	8
1.4 Enantioselectividade Enzimática	11
1.5 Emulsões	13
1.5.1 Surfactantes	16
1.5.2 Líquidos iónicos como surfactantes	20
1.6 Biocatálise em Meios Não Convencionais	22
1.6.1. Solventes orgânicos	22
1.6.1. Miniemulsões	24
1.7 Novos Agentes Acilantes Iónicos utilizados na resolução cinética enzimática de álcoois secundários	27
CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Reagentes	29
2.2 Secção Experimental	31
2.2.1 Procedimentos Experimentais	34
CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 Cálculo das CMCs dos diferentes AASIs tanto na forma de ácidos como na forma de ésteres	39
3.2 Estudo do efeito da utilização de diferentes álcoois secundários e diferentes co-surfactantes na formação de miniemulsões.	42
3.3 Estudo da reactividade de dois álcoois diferentes, um álcool primário (álcool benzílico) e um álcool secundário (1-feniletanol)	43

3.4 Estudo da utilização de dois agentes acilantes de tamanhos diferentes, ácido octanóico e ácido 11-bromoundecanóico, em reacções de esterificação com o 1-feniletanol.	45
3.5 Estudo de novos agentes surfactantes que funcionam também como agentes acilantes, AASIs, em reacções de esterificação e transesterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.	48
3.5.1 Utilização de AASIs (1 e 2), em reacções de esterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.	48
3.5.2 Utilização de AASIs (4, 5, 6, e 7), em reacções de transesterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.	52
3.6 Estudo da resolução cinética enzimática do 1-feniletanol em sistemas de miniemulsões e posterior separação do (S)-1-feniletanol.	55
3.6.1 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol em sistemas de miniemulsões.	55
3.6.2 Separação do (S)-1-feniletanol após a resolução cinética enzimática deste composto.	57
3.7 Estudo da reacção de hidrólise do éster (etiloctanoato) ao longo do tempo.	59
3.8 Estudo da resolução cinética enzimática do sulcatol em sistemas de miniemulsões.	60
CAPÍTULO 4- CONCLUSÃO _____	65
CAPÍTULO 5- BIBLIOGRAFIA _____	67
CAPÍTULO 6- ANEXOS _____	70

Índice de Equações

Equação 1.1: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E).....	11
Equação 1.2: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir do $\Delta\Delta G^\ddagger$	11
Equação 1.3: Equação utilizada para o cálculo da energia livre de activação entre os enantiómeros R e S, $\Delta\Delta G^\ddagger$	11
Equação 1.4: Equação utilizada para o cálculo do excesso enantiomérico.....	12
Equação 1.5: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir das concentrações dos substratos, tanto iniciais (antes na reacção) como no decorrer da reacção.....	12
Equação 1.6: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir da conversão e dos excessos enantioméricos do produto e do substrato.....	12
Equação 1.7: Equação utilizada para o cálculo da conversão (c) da reacção.....	12
Equação 2.1: Equação utilizada para o cálculo das conversões.	32

Índice de Esquemas

Esquema 1.1: Constantes de velocidade relativas em resoluções cinéticas. ^[4]	2
Esquema 1.2: Resolução cinética enzimática dinâmica (RCD), em que se observa racemização dos substratos.	3
Esquema 1.3: Reacção de esterificação.	22
Esquema 1.4: Representação geral das reacções de esterificação enzimáticas estudadas por Landfester <i>et al.</i> . ^[61]	25
Esquema 1.5: Reacção num sistema de duas fases [eq. (1)] e num sistema de miniemulsões [eq. (2)], utilizando uma concentração de substrato de 242g/L. A enzima utilizada foi a lipase PS “Amano”. ^[36]	26
Esquema 3.1: Resolução cinética enzimática e separação de álcoois secundários em sistemas de miniemulsões compostos por AASIs.	38
Esquema 3.2: Reacções de esterificação do ácido octanóico com o álcool benzílico (10) e com o 1-feniletanol (15), catalisadas pela Lipase PS “Amano”.	43
Esquema 3.3: Reacções de esterificação do ácido octanóico (a) e do ácido 11-bromoundecanóico (b) com o 1-feniletanol (15), catalisadas pela Lipase PS “Amano”.	46
Esquema 3.4: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (15) com o AASI 1, na presença de lipase PS “Amano”.	48
Esquema 3.5: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (15) com dois AASIs 1 e 2, na presença de lipase PS “Amano”.	50
Esquema 3.6: Reacção de transesterificação do 1-feniletanol (15) com quatro AASIs (4, 5, 6, e 7), cujos contra-íões são o Br, o PF ₆ , o BF ₄ e o AOT, na presença de CALB L.	52
Esquema 3.7: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (15) com o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg).	55
Esquema 3.8: Reacção de hidrólise do etiloctanoato na presença de Lipase PS “Amano”.	59
Esquema 3.9: Reacção de esterificação do sulcatol (16) com o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg).	61

Índice de Figuras

Figura 1.1: Locais activos da estrutura da lipase B de <i>Candida antarctica</i> : a) Estrutura total da CALB; b) Figura detalhada dos locais activos da CALB. ^[27]	9
Figura 1.2: A conformação dos substituintes maior (L) e médio (M) e o grupo hidroxilo do enantiómero que reage mais depressa dos álcoois secundários como refere a regra de Kazlauskas.	10
Figura 1.3: Mecanismo da reacção de hidrólise ou esterificação, catalisada pela CALB. ^[27]	10
Figura 1.4: Esquema da formação de um sistema de miniemulsões. ^[34]	14
Figura 1.5: Representação da curva da tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactante.	18
Figura 1.6: Representação do “Krafft point” numa curva de solubilidade do surfactante.	19
Figura 1.7: Estrutura de LIs surfactantes. ^[53]	21
Figura 1.8: Reacção de esterificação em sistemas de miniemulsões directas. ^[60]	24
Figura 1.9: Estrutura dos agentes acilantes iónicos.	27
Figura 3.1: Imagens obtidas por microscopia com ampliação de 500x de uma mistura reaccional contendo 1-feniletanol (a) e álcool benzílico (b).	44
Figura 3.2: Imagens obtidas por microscopia com ampliação de 500x de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico (c) e ácido 11-bromoundecanóico (d).	46
Figura 3.3: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x, de uma mistura reaccional contendo AASI 1.	48
Figura 3.4: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x, de uma mistura reaccional contendo AASI 1 (e). Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (f) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação de 200x (g), de uma mistura reaccional contendo AASI 2.	50
Figura 3.5: Imagens obtidas por microscopia com uma ampliação de 200x, de uma mistura reaccional contendo AASI 4 (h), AASI 6 (i) e AASI 7 (j).	52
Figura 3.6: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x (k) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 200x (l), de uma mistura reaccional contendo AASI 5.	53

Figura 3.7: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x (m) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 200x (n), de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico e 1-feniletanol como substratos.	55
Figura 3.8: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (o) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 500x (p), de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico e sulcatol como substratos.	61
Figura 6.1: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (a) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (b), utilizando 2-pentanol como álcool secundário.	74
Figura 6.2: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (c) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (d), utilizando 2-heptanol como álcool secundário.	74
Figura 6.3: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (e) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (f), utilizando 2-octanol como álcool secundário.	74
Figura 6.4: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (g) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (h), utilizando 2-decanol como álcool secundário.	75
Figura 6.5: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (i) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (j), utilizando 1-feniletanol como álcool secundário.	75
Figura 6.6: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 1% de n-hexadecano (a), de tolueno (b), de éter diisopropílico (c), de MTBE (d), de hexano (e) e de decano (f).	76
Figura 6.7: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 2% de n-hexadecano (g), de tolueno (h), de éter diisopropílico (i), de MTBE (j), de hexano (k) e de decano (l).	77
Figura 6.8: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 4% de n-hexadecano (m), de tolueno (n), de éter diisopropílico (o), de MTBE (p), de hexano (q) e de decano (r).	78
Figura 6.9: Representação de uma curva teórica com três parâmetros, ees, eep e conversão, da resolução RCE do sulcatol com ácido octanóico, na presença de Lipase PS “Amano”.	83
Figura 6.10: Representação do espectro de ^1H RMN com os picos correspondentes ao sulcatol e ao R-octanoato de 1,5-dimetil-hex-4-enilo.	84

Índice de Gráficos

Gráfico 1.1: Conversão em função do tempo da reacção do 3-fenil-1-propanol com ácidos carboxílicos lineares com comprimentos de cadeia de C7-C12 na presença da Lipase PS “Amano”. ^[61]	25
Gráfico 3.1: Representação gráfica da tensão superficial em função do logaritmo da concentração dos AASIs 1, 2 e 3.	39
Gráfico 3.2: Representação gráfica da tensão superficial em função do logaritmo da concentração dos AASIs 4, 5, 6, 8 e 9.	40
Gráfico 3.3: Representação gráfica das conversões de ambos os substratos, 1-feniletanol (15) e álcool benzílico (10) ao longo do tempo para reacções de esterificação com o ácido octanóico catalisadas pela Lipase PS “Amano”.	44
Gráfico 3.4: Representação gráfica das conversões de 1-feniletanol (15) em reacções de esterificação com o ácido octanóico (a) e o ácido 11-bromoundecanóico (b).	47
Gráfico 3.5: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando o AASI 1 na presença da CALB L, sem utilizar lutensol. .	49
Gráfico 3.6: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando dois AASIs 1 e 2 em reacções de esterificação, na presença da Lipase PS “Amano”.	51
Gráfico 3.7: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando quatro agentes AASIs 4, 5, 6 e 7, na presença de CALB L.	53
Gráfico 3.8: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando como agente acilante o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano”.	56
Gráfico 3.9: Representação gráfica da razão de áreas de etiloctanoato (substrato) sobre áreas de ácido octanóico (produto), obtidas a partir de uma reacção de hidrólise na presença de Lipase PS “Amano”.	60
Gráfico 3.10: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-sulcatol ao longo do tempo, utilizando como agente acilante o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano”.	62
Gráfico 3.11: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-sulcatol ao longo do tempo, utilizando duas concentrações diferentes de ácido octanóico (1eq e 3eq), na presença de Lipase PS “Amano”.	64
Gráfico 6.1: Curva de calibração obtida para o 1-feniletanol. Representação gráfica da área de 1-feniletanol em função da percentagem de 1-fenietanol.	71

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Exemplos de surfactantes catiónicos, aniônicos e não iônicos.	19
Tabela 1.2: Valores de rendimentos e excessos enantioméricos obtidos após a resolução cinética enzimática e separação de enantiómeros, utilizando CALB L.	28
Tabela 2.1: Representação das estruturas dos diferentes agentes acilantes surfactantes iônicos.	29
Tabela 2.2: Representação das estruturas dos diferentes álcoois.	30
Tabela 3.1: Representação dos valores dos CMCs dos AASIs (1-6, 8 e 9)	41
Tabela 3.2: Estudo do efeito de diferentes concentrações de NaCl, 10%, 20% e 30%, na remoção dos 2% de 1-feniletanol que se encontram solúveis em água.	58
Tabela 3.3: Estudo do efeito de diferentes concentrações de NaCl, 10%, 20% e 30%, a uma temperatura de 4°C, na remoção dos 2% de 1-feniletanol que se encontram solúveis em água.	58
Tabela 3.4: Estudo do efeito da adição de 30% de NaCl numa mistura reaccional com 1-feniletanol.	58
Tabela 3.5: Resultados obtidos da RCE de sulcatol com o ácido octanóico, na presença de Lipase PS “Amano”, após 192h. ^a Determinado por GC. ^b Determinado pela equação 1.7. ^c Determinado por ¹ H RMN.....	63
Tabela 6.1: Valores dos volumes adicionados de uma solução de 20mg/ml de 1-feniletanol e dos volumes adicionados de água para preparar amostras com diferentes percentagens de 1-feniletanol.	70
Tabela 6.2: Valores das percentagens de 1-feniletanol das amostras padrão e áreas dos picos correspondentes obtidas por HPLC.	70
Tabela 6.3: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 1 e AASI 2, necessários para a obtenção das CMCs.	71
Tabela 6.4: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 3, necessários para a obtenção das CMCs.	72
Tabela 6.5: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 4 e AASI 5, necessários para a obtenção das CMCs.	72
Tabela 6.6: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 6, necessários para a obtenção das CMCs.	73

Tabela 6.7: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 8 e AASI 9, necessários para a obtenção das CMCs.	73
Tabela 6.8: Conversões do 1-feniletanol e do álcool benzílico em octanoato de 1-feniletilo e octanoato de benzilo, respectivamente, em reacções de esterificação enzimáticas. ^a Determinada por HPLC.	79
Tabela 6.9: Conversões do 1-feniletanol em octanoato de 1-feniletilo e em 11-bromoundecanoato de 1-feniletilo, em reacções de esterificação enzimática. ^a Determinada por HPLC.	79
Tabela 6.10: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando os AASIs 1 e 2 , na presença da lipase PS “Amano”. ^a Determinado por GC.....	80
Tabela 6.11: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o AASI 1 na presença de CALB L, sem utilizar Lutensol. ^a Determinado por GC.....	80
Tabela 6.12: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o AASI 4 e 5 na presença de CALB L. ^a Determinado por GC.	81
Tabela 6.13: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando os AASIs 6 e 7 na presença de CALB L. ^a Determinado por GC.	81
Tabela 6.14: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg). ^a Determinado por GC.....	82
Tabela 6.15: Resultados obtidos da reacção de hidrólise do etiloctanoato, na presença de Lipase PS “Amano”. ^a Determinada por GC.....	82
Tabela 6.16: Resultados obtidos da RCE de sulcatol utilizando o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg). ^a Determinado por GC.....	83
Tabela 6.17: Resultados obtidos da RCE de sulcatol utilizando duas concentrações diferentes de ácido octanóico (1eq e 3eq), na presença de 20mg de Lipase PS “Amano”. ^a Determinado por GC.....	84

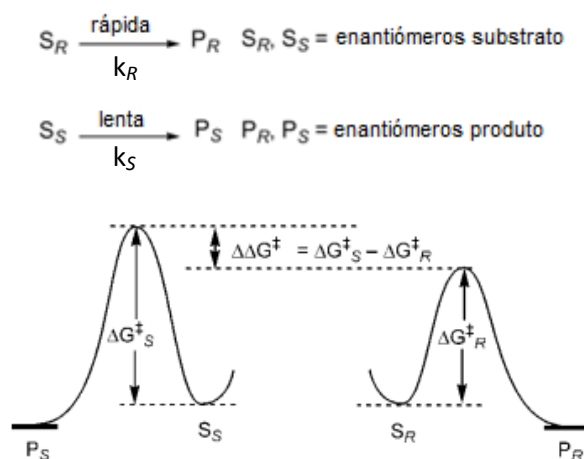
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

1.1 Resolução Cinética

A síntese de álcoois enantiomericamente puros é bastante importante para a indústria farmacêutica, sendo estes álcoois utilizados como intermediários na produção de ingredientes farmacêuticos activos. Estes compostos podem ser obtidos, em larga escala, através de processos assimétricos químicos ou biotecnológicos^{[1],[2]}. A resolução cinética de racematos utilizando enzimas tem sido uma importante ferramenta para a obtenção de compostos quirais de elevada importância biológica.

A resolução cinética é um processo no qual um dos enantiómeros de uma mistura racémica é mais facilmente transformado num produto do que a molécula correspondente à sua imagem no espelho. O principal requisito deste processo é que as constantes de velocidade do enantiómero R e do enantiómero S de um dado composto sejam diferentes ($k_R \neq k_S$).

Se para esta resolução for utilizado um catalisador de origem biológica (normalmente enzimas), o processo é denominado por resolução cinética enzimática (RCE) ou resolução biocatalítica. Nos últimos anos tem existido uma investigação bastante intensa na área dos processos de RCE. Em RCEs um substrato racémico sofre uma reacção enzimática onde ocorre uma discriminação de enantiómeros devido a estes apresentarem diferentes velocidades de reacção na presença de uma enzima.^[3] Numa RCE, as velocidades relativas de reacção para os substratos enantioméricos, são ditadas pela energia livre de Gibbs ($\Delta\Delta G^\ddagger$). Isto corresponde à diferença dos estados de transição no passo determinante de selectividade da reacção catalítica.^[4] Cada substrato apresenta uma determinada energia de transição (formação do complexo enzima-substrato), e dessa forma reage a uma velocidade diferente possibilitando a sua resolução, como exemplificado no esquema 1.1.



Esquema 1.1: Constantes de velocidade relativas em resoluções cinéticas.^[4]

Para este esquema 1.1, em particular, o enantiómero R é o que reage mais rapidamente, apresentando uma energia de Gibbs mais baixa, evidenciando maior velocidade de reacção.

Nos casos ideais, onde a diferença de velocidade reaccional dos enantiómeros é muito grande, apenas um enantiómero é transformado em produto e a reacção quando atinge cerca de 50% de conversão, resulta num substrato e num produto enantiomericamente puros. Contudo, quando esta diferença de velocidade de reacção não é assim tão grande, a reacção ocorre de uma forma bastante lenta e existe um decréscimo na enantioselectividade.

A utilização de enzimas neste tipo de processos permite a obtenção de velocidades de reacção bastante elevadas, 10^{12} vezes mais rápidas do que utilizando métodos químicos, melhorando a eficiência, e aumentando a quimio-, regio- e enantioselectividade. No que diz respeito a um contexto ambiental, os processos biocatalíticos são mais verdes, menos perigosos (ex: não utilização de bases fortes) e menos poluentes.^[3] A RCE permite também que o material de partida resolvido e o produto formado sejam facilmente separados e que num caso ideal, tanto o produto como o substrato resolvido sejam recuperados numa forma enantiomérica elevada.^[4]

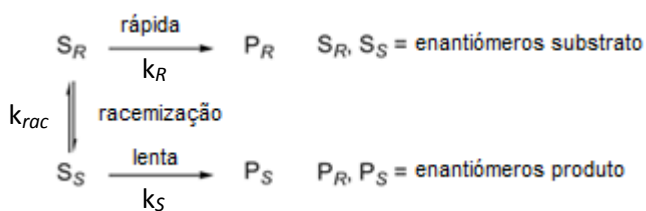
Contudo, este método também possui algumas limitações, tanto a nível económico como a nível ecológico. Uma das principais limitações é a necessidade de utilização de uma grande quantidade de agente acilante para se obter conversões elevadas, com consequente geração de produtos secundários que podem influenciar o sentido da reacção.^[5] Para além desta limitação, outra grande desvantagem deste

método é a separação dos produtos obtidos. Os dois enantiómeros obtidos, um na forma de álcool e outro na forma de éster (produto resultante da reacção de esterificação do agente acilante com o álcool), normalmente são separados através de técnicas cromatográficas. A utilização destas técnicas à escala industrial é completamente proibitiva, devido ao seu elevado custo, tornando-se necessário encontrar alternativas a este tipo de técnicas.^[6]

Uma das alternativas que podem ser utilizadas na separação de enantiómeros é a utilização de agentes acilantes surfactantes iónicos (AASI). Esta metodologia vai ser estudada por nós durante o trabalho experimental e permite uma separação mais eficaz e económica dos enantiómeros após a RCE. O AASI tem características muito particulares, contendo na sua estrutura duas partes distintas, uma unidade iónica (anel imidazol) e outra unidade acilante (ácido ou éster) reconhecida pela enzima, para permitir a RCE e a separação do éster e do álcool que não reage. A principal vantagem deste processo é a possibilidade de separação de ambos os enantiómeros de uma mistura racémica utilizando apenas um equivalente de AASI.^[7]

1.2 Resolução Cinética Dinâmica

As resoluções cinéticas, como já foi referido anteriormente têm uma grande utilidade mas apresentam uma limitação intrínseca, conseguem no máximo atingir 50% de conversão do enantiómero desejado.^[3] A utilização da resolução cinética dinâmica (RCD) permite ultrapassar este problema através da racemização do enantiómero menos desejado para se tornar um substrato que a enzima consiga aceitar e assim reagir para que mais de 50% de substrato possa ser resolvido. Assim, o enantiómero que não reage é continuamente isomerizado durante o processo de resolução levando potencialmente a uma eficiente conversão de todo o material de partida no produto desejado,^[8] como representado no esquema 1.2. Esta conversão, do ponto de vista teórico, pode chegar a 100%.



Esquema 1.2: Resolução cinética enzimática dinâmica (RCD), em que se observa racemização dos substratos.

São necessários os seguintes aspectos para uma RCD eficiente:

- (1) O passo de resolução cinética tem de ser irreversível;
- (2) O valor de E (razão enantiomérica), que é referido no ponto 1.4 da Introdução, tem de ser pelo menos 30, preferencialmente numa gama entre 50 e 100;
- (3) O k_{rac} tem de ser pelo menos igual ao k_R (velocidade de reacção do enantiómero que reage mais rapidamente), para que elevadas conversões e enantioselectividades sejam atingidas. Por outras palavras, para que a DKR seja eficiente, é necessário que a racemização ocorra mais rápido do que a resolução cinética.^[3]

Relativamente, à aplicação deste método na resolução de álcoois enantioméricos, tem sido utilizada ultimamente a combinação catalisador químico para racemização e biocatalisador quiral, sendo esta chamada de resolução quimioenzimática. Assim, para existir uma RCD quimioenzimática eficiente é necessário que estejam presentes algumas condições. As enzimas normalmente trabalham em condições suaves de pressão e temperatura, enquanto os catalisadores químicos são normalmente mais eficientes a temperaturas acima de 80°C, dessa forma tem de existir um compromisso das condições de ambos os catalisadores. Parâmetros como a natureza do solvente precisam de ser optimizados porque influenciam a actividade da enzima e a solubilidade e reactividade do catalisador químico.

A escolha do método de racemização depende da natureza do substrato (que está sujeito à racemização) e dos catalisadores utilizados na racemização, que têm sido normalmente bases, enzimas e metais de transição.^[8]

1.3 Enzimas

A biocatálise neste momento é uma das tecnologias mais verdes, utilizadas não apenas a nível académico mas também industrial. Esta é cada vez mais utilizada na produção de químicos, intermediários farmacêuticos e agroquímicos, compostos activos farmacêuticos e alimentares. Um elevado número de processos têm sido implementados na indústria, devido essencialmente à elevada procura de compostos quirais complexos, e também à necessidade dos processos serem ambientalmente mais limpos.^[9]

A biocatálise pode ser definida como a aplicação de um biocatalisador para atingir uma conversão desejada em condições controladas num bioreactor. O biocatalisador pode ser uma enzima, um complexo enzimático, um organelo celular ou uma célula.^[10] Este actua como qualquer outro catalisador, do ponto de vista termodinâmico, reduzindo a magnitude da barreira de energia de activação, necessária para a conversão química de uma substância em outra, e permite desta forma que reacções químicas que não ocorrem espontaneamente possam ocorrer a uma velocidade significativa. Os biocatalisadores, teoricamente, não são consumidos ou alterados durante a reacção, portanto poderiam ser utilizados indefinidamente para converter o substrato em produto. Contudo, um dos grandes problemas na prática é a falta de estabilidade do biocatalisador, que é a sua incapacidade em manter a sua estrutura activa durante toda a reacção.^[11]

Nos últimos anos, tem existido um aumento exponencial na produção de compostos químicos com elevado valor de mercado utilizando enzimas para catalisar transformações de apenas um passo ou células para catalisar reacções de múltiplos passos.^[10] As enzimas são moléculas proteicas que catalisam uma vasta gama de reacções bioquímicas, muitas delas sendo bastante complexas para ocorrerem por síntese química. São necessárias em todos os sistemas vivos para catalisarem todas as reacções bioquímicas necessárias para a sobrevivência e reprodução.

As enzimas são classificadas em seis grandes grupos que estão relacionados com as reacções que catalisam:

- (1) Oxidoreductases (oxidação-redução);
- (2) Transferases (transferem grupos químicos);
- (3) Hidrolases (quebram uma ligação simples através da adição de água);
- (4) Liasas (quebram ligações não hidrolíticas- eliminação de um grupo para formar uma ligação dupla, ou quebra de uma ligação simples para formar dois produtos);
- (5) Isomerases (mudanças nos arranjos dos átomos nas moléculas- rearranjo interno ou isomerização);
- (6) Ligases (junção de duas ou mais moléculas).

As enzimas estão presentes em animais e plantas mas também em fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Microorganismos nativos ou recombinantes

produzem uma vasta gama de enzimas com variações relativamente à especificidade ao substrato, velocidade de reacção, estabilidade térmica e pH óptimo. Enzimas microbianas são relativamente fáceis de obter por processos de fermentação e com alguns passos de purificação.^[12]

As enzimas apresentam algumas vantagens relativamente aos catalisadores químicos, nomeadamente no que concerne à sua selectividade, sendo selectivas para o substrato (capacidade de seleccionar substratos distintos mas com estruturas semelhantes), enantioselectivas (preferência por um ou outro enantiómero), regioselectivas (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula de substrato) e quimioselectivas (preferência por um determinado grupo funcional presente no substrato). As enzimas também apresentam elevada actividade em condições moderadas (pressão, temperatura e gama de valores de pH moderados), são biodegradáveis (tornando os processos ambientalmente mais limpos) e também são consideradas produtos naturais. Como principais desvantagens da enzima, temos a sua baixa estabilidade em condições extremas, a sua elevada complexidade molecular e também os seus custos.^[11]

1.3.1 Lipases

As lipases pertencem à classe das hidrolases (hidrolases de triacilglicerol, E.C. 3.1.1.3), que são enzimas que catalisam a quebra de ligações simples, como por exemplo ligações C–O, C–N, C–C e P–O, através da adição de água. As hidrolases são um dos tipos de enzimas mais utilizados industrialmente, sendo estimada 80% de utilização. Existem outras enzimas também presentes em grande quantidade, as oxidoreductases, mas a sua utilização é limitada devido à sua dependência de co-factores e portanto, as transformações industriais catalisadas por esta enzima têm de estar acopladas a outros processos para uma eficiente reciclagem dos co-factores.^[12]

As lipases são geralmente utilizadas na preparação e resolução de álcoois quirais, ésteres, ácidos carboxílicos e lactonas através de reacções de hidrólise, esterificação e transesterificação.^[13] Este tipo de enzimas possui uma vasta área de aplicação no ramo industrial, principalmente na síntese orgânica, tendo sido utilizadas com bastante sucesso na resolução de misturas racémicas e na síntese de vários intermediários quirais complexos, e químicos bastante utilizados na indústria

farmacêutica, química, alimentar, de papel e celulose, e de detergentes. Uma das suas aplicações está na síntese de mono e diglicéridos, os quais são utilizados na indústria alimentar e são utilizados como emulsificadores em cosméticos e farmacêuticos para preparações de libertação controlada.^[14]

As lipases são catalisadores versáteis que apresentam uma elevada quimio-, regio- e enantioselectividade, aceitando uma grande variedade de substratos com importância industrial elevada.^[15] As principais razões para o elevado potencial tecnológico destas enzimas, para além da sua selectividade são: elevada disponibilidade, baixo custo de produção, elevada estabilidade em condições adversas tanto em solventes orgânicos como quando sujeitas a elevadas temperaturas, e não necessitam de co-factores.^[16]

Relativamente à sua estrutura, as lipases possuem um “fold” α/β -hidrolase (composto por uma folha β central hidrofóbica, que consiste em oito cadeias β diferentes ligadas a seis hélices α), um local activo formado por uma tríade catalítica de resíduos de serina, aspartato (ou glutamato) e histidina, uma cavidade de oxianião, e na maioria dos casos uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” formada por uma hélice α que cobre o local activo da enzima. O resíduo de serina (pertencente à tríade catalítica) encontra-se localizado exactamente no mesmo local da folha β central, num pentapeptídeo GXSXG altamente conservado.^[17]

As lipases funcionam eficientemente em sistemas reaccionais contendo uma fase orgânica e uma aquosa,^[18] actuando preferencialmente na interface óleo/água existindo um aumento drástico da actividade enzimática, entre a fase hidrofóbica contendo os substratos e a fase hidrofílica contendo a lipase dissolvida, e contrariamente às esterases (outras enzimas pertencentes à classe das hidrolases), estas catalisam reacções em que os substratos são insolúveis em água.^[19] Este aumento na actividade enzimática deve-se essencialmente aos rearranjos estruturais da região do local activo da lipase. Quando a interface óleo-água não está presente, o local activo é coberto por uma “tampa”. Quando a lipase se encontra em contacto com a interface óleo-água, ocorre uma alteração conformacional na “tampa”, onde o centro activo se desloca, expondo a enzima, e a superfície hidrofóbica maior e os resíduos catalíticos tornam-se acessíveis para a ligação do substrato. Vários estudos indicam que a presença de uma estrutura tipo “tampa” não está necessariamente relacionada com a activação interfacial. Existem lipases que não demonstram actividade interfacial apesar de possuírem estruturas tipo “tampa” a

cobrirem os seus locais activos. Contudo, a presença desta estrutura apresenta um importante papel na modulação da actividade, estabilidade, especificidade e enantioselectividade das lipases.^[20]

1.3.2 CALB (Lipase B de *Candida antarctica*)- Estrutura e Origem

A CALB é uma lipase, com 33 KDa, isolada de um fungo do género basidiomicetas, *Candida antarctica*, e foi identificada com o objectivo de encontrar uma enzima bastante resistente, que suportasse condições extremas (elevada estabilidade a pH alcalino e a temperaturas bastante elevadas).^[21] A levedura *Candida antarctica* foi originalmente isolada na Antárctica e foi posteriormente utilizada para produzir duas variantes da lipase, CALA e CALB, que foram clonadas e expressas em *Aspergillus oryzae*.^[22] Como foi referido anteriormente, a maior parte das lipases demonstram activação interfacial, como a CALA, mas o mesmo não acontece com a CALB.^[23]

A CALB é uma enzima muito bem caracterizada e com uma utilidade bastante diversificada. Esta enzima, na forma imobilizada, é bastante estável, particularmente em condições não aquosas, onde o catalisador permanece activo por muitas horas na presença de elevadas concentrações de surfactante às vezes com agitação vigorosa.^[24]

A CALB catalisa a hidrólise de ésteres em soluções aquosas como também reacções de esterificação em solventes orgânicos. A sua grande área de aplicação está na resolução cinética de álcoois secundários, aminas, e ácidos, ou na preparação de compostos opticamente activos a partir de reagentes *meso*.^[25]

A CALB apresenta 317 aminoácidos e a sua estrutura cristalina revela que esta possui uma α/β hidrolase com um centro activo composto por uma tríade catalítica Ser105-His224-Asp187 (ver figuras 1.1 (a) e (b)), comum às hidrolases de serina. Este centro activo encontra-se aberto, contrariamente à maioria das lipases, em que o centro activo encontra-se coberto por uma “tampa” hidrofóbica. A CALB apresenta uma hélice hidrofóbica de cinco resíduos (hélice $\alpha 5$), que foi identificada como uma potencial “tampa”, mas verificou-se que esta não está envolvida em qualquer alteração conformacional que regulasse o acesso ao centro activo, mas sim actua como uma superfície de ligação lipídica, ancorando a lipase à interface óleo-água.^[26]

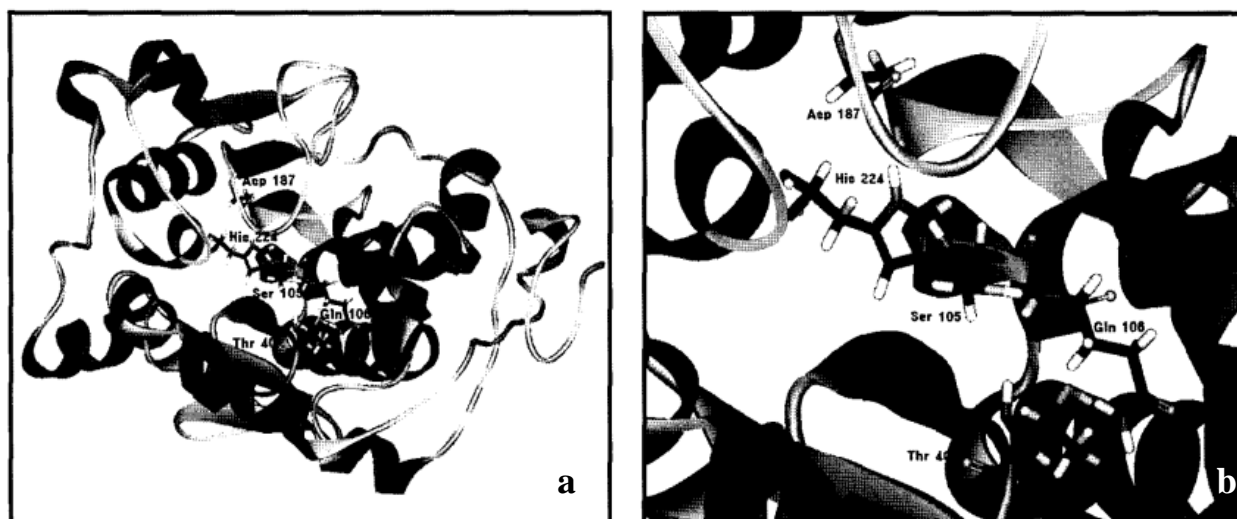


Figura 1.1: Locais activos da estrutura da lipase B de *Candida antarctica*: a) Estrutura total da CALB; b) Figura detalhada dos locais activos da CALB.^[27]

O local activo também contém uma cavidade mais pequena, chamada bolso de estereoespecificidade, no qual os álcoois enantioméricos têm de orientar um substituinte durante a catálise. Podendo ser utilizado para prever a reactividade de uma vasta gama de substratos.^[28] Isto explica a elevada estereoselectividade da CALB para álcoois secundários.^[26]

Existem alguns modelos mais simples da selectividade enzimática, como por exemplo a regra desenvolvida por Prelog, que previa que um enantiómero reagia mais rapidamente, devido ao seu tamanho ou à hidrofobicidade dos substituintes no estereocentro. Esta regra foi desenvolvida para a redução da enantioselectividade de cetonas, através da reacção de esterificação catalisada pela levedura *Culvaria lunata*, e baseava-se no tamanho dos substituintes do grupo carbonilo. A vantagem desta regra é que pode ser aplicada a uma vasta gama de substratos, mas a desvantagem é que existem excepções a esta regra.^[29]

Uma das regras empíricas mais aceites para o reconhecimento quiral por lipases para álcoois secundários, foi descrita por Kazlauskas *et al.*^[29], refere que o centro activo da enzima possui dois bolsos de tamanho diferentes, sendo um deles maior que o outro (ver figura 1.2), melhorando a eficiência das resoluções.

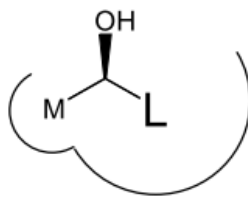


Figura 1.2: A conformação dos substituintes maior (L) e médio (M) e o grupo hidroxila do enantiômero que reage mais depressa dos álcoois secundários como refere a regra de Kazlauskas.

O enantiômero que consegue encaixar da melhor forma no centro activo da enzima irá reagir mais depressa, e o outro enantiômero que apresenta uma orientação oposta dos seus substituintes, em que o substituinte maior não é facilmente acomodado ao bolso mais pequeno, exibirá uma velocidade de reacção mais lenta. A enantioselectividade prevista pela regra de Kazlauskas normalmente prevê uma selectividade ao enantiômero R.^{[28],[30]}

A CALB catalisa reacções de transferência de grupos acilo, tendo sido sugerido um mecanismo denominado de *ping-pong bi-bi*, como representado na figura 1.3.

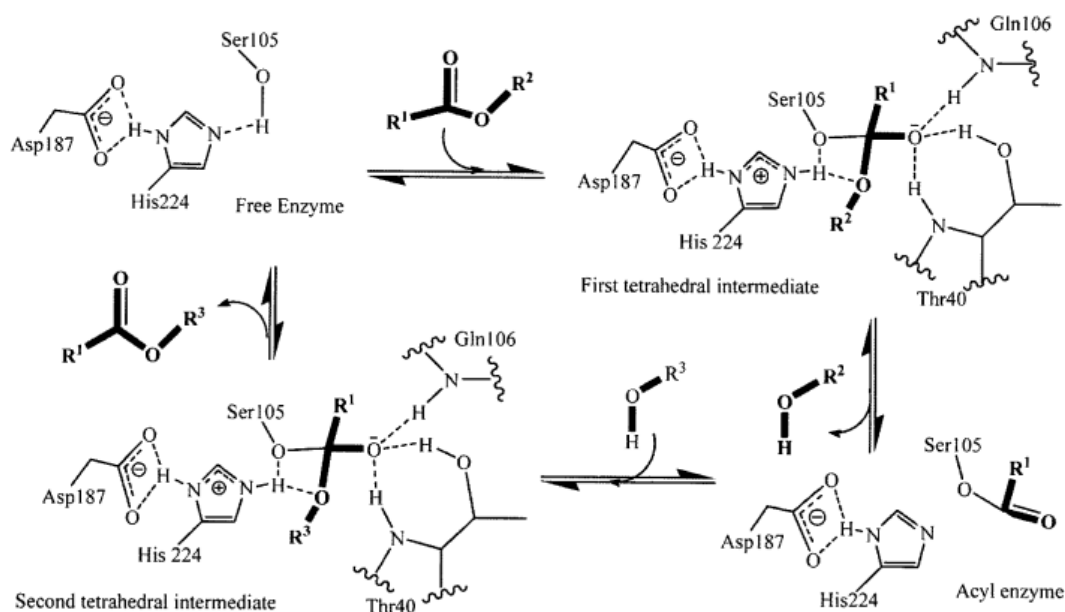


Figura 1.3: Mecanismo da reacção de hidrólise ou esterificação, catalisada pela CALB.^[27]

O mecanismo começa com a adição de um substrato (molécula acilante) que entra no local activo da enzima, existindo um ataque nucleofílico por parte do oxigénio da serina ao átomo de carbono do grupo carbonilo presente numa ligação éster do substrato inicial, formando-se assim o primeiro intermediário tetraédrico. O primeiro

produto sai do local activo e depois forma-se o complexo enzima-acilo. Seguidamente, há a adição de um segundo substrato (molécula de álcool) que entra no local activo e ataca nucleofilicamente o complexo enzima-acilo, formando-se um segundo intermediário tetraédrico. Por último, este intermediário acaba por perder uma molécula de éster (produto da reacção) que deixa o local activo e a enzima está novamente pronta para outro ciclo catalítico.^[27]

1.4 Enantioselectividade Enzimática

A enantioselectividade é a propriedade intrínseca de uma enzima para um substrato específico e é causada pela diferença de uma barreira de energética, que os substratos têm de atingir para a reacção prosseguir.^[31] A enantioselectividade de uma reacção enzimática que segue a cinética de Michaelis-Menten pode ser quantitativamente descrita pela razão enantiomérica (E), que é definida como a razão das constantes de especificidade dos dois substratos enantioméricos (ver equação 1.1).

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S}$$

Equação 1.1: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E).

O valor E também está relacionado com a diferença na energia livre de activação entre os enantiómeros R e S, $\Delta\Delta G^\ddagger$ (ver equação 1.2).

$$E = e^{-\frac{(\Delta\Delta G^\ddagger)}{RT}}$$

Equação 1.2: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir do $\Delta\Delta G^\ddagger$.

Devido à energia livre no estado fundamental ser a mesma para ambos os enantiómeros R e S, a diferença na energia livre de activação entre os enantiómeros equivale à diferença de energia do estado de transição absoluto dos dois enantiómeros, como está presente na equação 1.3.^[32]

$$\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta G_R^\ddagger - \Delta G_S^\ddagger = G_R^\ddagger - G_S^\ddagger$$

Equação 1.3: Equação utilizada para o cálculo da energia livre de activação entre os enantiómeros R e S, $\Delta\Delta G^\ddagger$.

Como referido anteriormente, na resolução cinética a formação tanto de produto como substrato varia ao longo da reacção. Dessa forma é essencial calcular e ter em consideração o excesso enantiomérico (ee) e o valor E.

O ee é um parâmetro que indica a pureza óptica de um composto enantiomérico e é definido pela equação 1.4,

$$ee = \frac{|C_S - C_R|}{C_S + C_R}$$

Equação 1.4: Equação utilizada para o cálculo do excesso enantiomérico.

onde C_S e C_R são as concentrações do enantiómero S e do enantiómero R na mistura, respectivamente. A razão enantiomérica pode também ser calculada a partir das concentrações dos enantiómeros, segundo a equação 1.5, e pode também ser expressa pela equação 1.6 no caso dos sistemas biocatalíticos serem irreversíveis,

$$E = \frac{\ln(C_S/C_{S0})}{\ln(C_R/C_{R0})}$$

Equação 1.5: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir das concentrações dos substratos, tanto iniciais (antes na reacção) como no decorrer da reacção.

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]} = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]}$$

Equação 1.6: Equação utilizada para o cálculo da razão enantiomérica (E) a partir da conversão e dos excessos enantioméricos do produto e do substrato.

onde C_{S0} e C_{R0} são as concentrações iniciais do enantiómero S e do enantiómero R antes da reacção, respectivamente, e c é o grau de conversão da reacção, e ee_p e ee_s são os excessos enantioméricos do produto e do substrato, respectivamente.^[33]

Para o cálculo da conversão da reacção, utilizou-se a equação 1.7.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Equação 1.7: Equação utilizada para o cálculo da conversão (c) da reacção.

O valor E é muito importante porque permite determinar a enantioselectividade da reacção e permite determinar o desempenho da enzima em determinadas condições reaccionais. As condições reaccionais (isto é, solvente utilizado, temperatura e pH)

influenciam a velocidade das reacções catalisadas por enzimas e apresentam um elevado efeito na enantioselectividade da reacção. Em geral, elevadas temperaturas conduzem a uma enantioselectividade da reacção baixa. Quanto maior a diferença entre as barreiras de energia para os dois substratos enantioméricos, mais a temperatura influencia a enantioselectividade da enzima.^[31]

1.5 Emulsões

Uma emulsão é uma mistura de dois líquidos imiscíveis. O sistema de emulsões é caracterizado por apresentar uma substância, a fase dispersa, dispersa numa outra, a fase contínua.^[34] Existem vários exemplos de emulsões presentes diariamente na nossa vida, como por exemplo, leite, manteiga e margarina, e maionese, etc. No caso da manteiga e da margarina, as emulsões são formadas por uma fase de óleo líquida contínua envolvendo gotículas de água (emulsões água-em-óleo), estas emulsões são conhecidas por emulsões inversas. Pelo contrário, emulsões óleo-em-água são designadas por emulsões directas.^[35]

As emulsões normalmente apresentam uma turbidez, porque estas possuem muitas interfaces (barreira entre as fases) que dispersam a luz que passa através da emulsão. A interface é, na realidade, uma transição contínua entre duas fases, isto é, uma “camada limite”. Para se poderem formar estas emulsões, um aspecto importante é a diminuição da tensão superficial, que pode ser definida como a energia necessária para aumentar a superfície da fase, através da adição de um surfactante.

As emulsões são subdivididas em três tipos, macro-, mini- e microemulsões, dependendo de diversos parâmetros, como tamanho da gotícula, quantidade de surfactante, estabilidade, etc. O tamanho das gotículas das macro-, mini e microemulsões estão normalmente na gama de alguns micrómetros, centenas de nanómetros e dezenas de nanómetros, respectivamente. O tamanho das gotículas deve ser reduzido para facilitar a transferência de massa e para aumentar a área interfacial, resultando na formação de mini e microemulsões. No que diz respeito à estabilidade, apenas as microemulsões são termodinamicamente estáveis. Estas formam-se espontaneamente, enquanto para se formarem os outros dois tipos de emulsões são necessárias forças de homogeneização.^[35]

Referindo especificamente as miniemulsões, estas são misturas homogêneas de dimensões muito pequenas com diâmetros entre 50-500nm preparadas através de agitação num sistema que contém quatro componentes: água, óleo, surfactante e co-surfactante (agente hidrofóbico).^{[34],[36]} Na figura 1.4 está representado um sistema de miniemulsões, em que numa primeira etapa existem duas fases, a fase I (phase I) que contém os substratos hidrofóbicos e o co-surfactante e a fase II (phase II) que contém a água e o surfactante. Numa segunda etapa a mistura reaccional é sujeita a uma ultrasonicação, sendo assim possível a formação de miniemulsões e posterior reacção.

Em miniemulsões directas, o tamanho da gotícula é determinado pela quantidade de água e de óleo, densidade do óleo, solubilidade do óleo, e quantidade de surfactante.^[34]

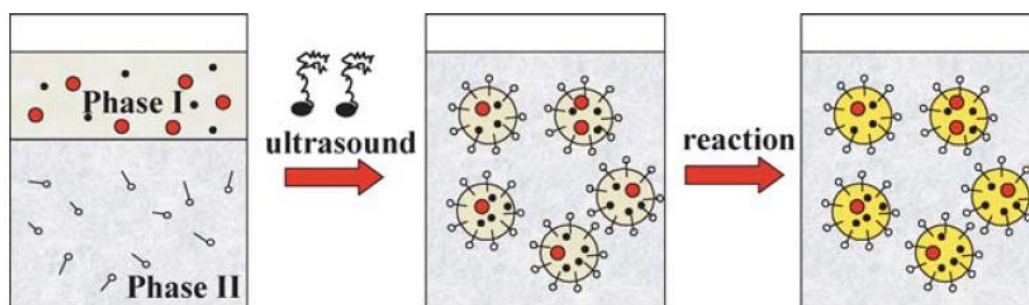


Figura 1.4: Esquema da formação de um sistema de miniemulsões.^[34]

Existem alguns fenómenos de desestabilização de emulsões, como por exemplo, a degradação por difusão molecular (também conhecida por amadurecimento de Ostwald ou destilação isotérmica) ou a coalescência, que podem levar à quebra das emulsões. A coalescência é o processo pelo qual duas ou mais gotículas se fundem para formar uma simples gotícula de tamanho maior, e o amadurecimento de Ostwald é o processo pelo qual as gotículas maiores crescem às custas das menores devido às diferenças nos seus potenciais químicos.^[34] No amadurecimento de Ostwald, o crescimento ocorre por difusão da fase dispersa através da fase contínua.^[37] Desta forma, para se criar emulsões estáveis de pequenas dimensões, estas devem estar estabilizadas contra os dois fenómenos acima referidos.

A estabilização das emulsões contra o fenómeno de coalescência é possível através da adição de surfactantes (agentes activos de superfície) apropriados, os quais adsorvem à interface da gotícula e produzem uma repulsão entre gotículas, permitindo

uma maior estabilização electrostática das gotículas. Quando as gotículas são formadas através da agitação mecânica a presença de surfactante reduz a tensão interfacial entre dois líquidos e consequentemente reduz a instabilidade termodinâmica do sistema, resultando no aumento da área interfacial entre os dois líquidos. Por outro lado, a adsorção do surfactante às interfaces resulta em barreiras eléctricas, estéricas e/ou mecânicas. As barreiras estéricas e eléctricas não permitem a aproximação de uma gotícula a outra. Já as barreiras mecânicas aumentam as resistências das gotículas dispersas ao choque mecânico e impedem que estas coalesçam quando elas colidem.^[38]

Contudo, mesmo quando o surfactante está presente, a distribuição do tamanho das gotículas depende da própria interacção entre as gotículas e de pressões de Laplace, as quais aumentam com o decréscimo do tamanho das gotículas, resultando num fluxo de massa por difusão entre gotículas. Assim, as emulsões desestabilizadas por amadurecimento de Ostwald podem ser estabilizadas através da adição de pequenas quantidades de um terceiro composto hidrofóbico, o qual deve estar preferencialmente distribuído na fase dispersa. A adição deste agente permite contrariar a pressão das gotículas ou de Laplace.^[34] A eficiência deste agente hidrofóbico na estabilização das gotículas aumenta com o decréscimo da solubilidade deste em água. Podem ser utilizados vários tipos de agentes hidrofóbicos, um dos mais utilizados é o hexadecano, mas também são utilizados vários alcanos com diferentes comprimentos de cadeia, corantes hidrofóbicos, comonomeros hidrofóbicos, silanos, siloxanos, isocianatos poliésteres, agentes fluorinados, etc.^[39]

Para se obter um sistema de miniemulsões, é necessário fornecer elevada energia para a homogeneização. A emulsificação inclui, deformação das gotículas e ruptura, as quais aumentam a área superficial específica das emulsões, e a estabilização das novas interfaces formadas por surfactantes. Para transformar gotículas de grandes dimensões em pequenas dimensões é necessário utilizar uma grande quantidade de energia, porque a resistência viscosa durante a agitação absorve grande parte dessa energia. Diferentes métodos podem ser utilizados para promover a homogeneização das emulsões em miniemulsões. A agitação simples foi utilizada no início, mas verificou-se que a energia transferida por esta técnica não é suficiente para uma distribuição de gotículas homogénea. Existem vários dispositivos de elevada força de dispersão que possuem elevada energia para transformar gotículas grandes em gotículas mais

pequenas, como por exemplo, a ultrasonicação que é bastante utilizada principalmente quando se pretende homogeneizar pequenas quantidades.^[34]

A ultrasonicação envolve a utilização de uma força de agitação criada por uma implosão de bolhas de cavitação de ondas de ultrasons. As ondas de ultrasons ou ondas ultrasónicas são os termos utilizados para descrever ondas elásticas com frequências acima dos 20000 Hz, acima da gama de frequência audível pelo ser humano.^[40] O efeito químico destas ondas é provavelmente originado a partir das bolhas de cavitação, as quais favorecem a difusividade das partículas dissolvidas na amostra, como também a partir das propriedades oxidativas dos radicais formados durante a ultrasonicação. Estas bolhas são submetidas a compressões e a expansões adiabáticas que aumentam a temperatura e a pressão dentro delas, embora estas flutuações tenham um efeito mínimo sobre a temperatura de um sistema como um todo.^[41]

1.5.1 Surfactantes

A tensão superficial corresponde a forças intermoleculares presentes na superfície de um fluído. As moléculas num fluído estão sujeitas a forças de atracção e de repulsão em todas as direcções devido às moléculas que as rodeiam. As forças de atracção acabam por predominar, visto que, as forças de repulsão são apenas importantes quando estão presentes pressões externas bastante elevadas.^[42]

A interacção de uma molécula com as moléculas vizinhas leva à redução da sua energia potencial, isto é, as forças intermoleculares actuam para estabilizar o sistema. As moléculas à superfície do fluído têm um menor número de moléculas vizinhas e portanto as suas energias potenciais não decrescem tanto como no interior do líquido. Estas moléculas que estão perto da superfície do fluído estão sujeitas a uma força mais fraca por parte da fase gasosa que se encontra na superfície (visto que na fase gasosa as moléculas encontram-se muito mais afastadas umas das outras), do que se a fase gasosa fosse substituída por um fluído. Estas moléculas sofrem uma força, que as vai retirar de volta para o interior do líquido.^[43] Por conseguinte, é necessário realizar trabalho contra esta força para a molécula voltar do interior para a superfície, e consequentemente as moléculas à superfície possuem mais energia do que as moléculas que estão no interior do líquido.

Considerando a energia potencial das moléculas de água no interior do líquido igual a zero, as moléculas na interface têm uma energia potencial positiva. Isto é caracterizado pela tensão superficial, a qual é a energia potencial dividida por área interfacial (J/m^2), a qual também pode ser representada como uma força por unidade de comprimento (N/m).^[42]

Os surfactantes também conhecidos como tensioactivos, são agentes que baixam a tensão superficial de um líquido e baixam a tensão interfacial entre dois líquidos. Estes compostos são normalmente orgânicos com carácter anfipático, ou seja, contêm grupos hidrofóbicos ou lipofílicos (as “caudas”) e grupos hidrofílicos ou lipofóbicos (as “cabeças”). Este carácter anfipático permite a estes compostos serem solúveis em água ou em solventes orgânicos.^[35] Apresentam um comportamento notável em soluções aquosas diluídas, onde as moléculas de surfactante se juntam para formar agregados a fim de garantir a segregação das suas partes hidrofóbicas em água.

Uma das características importantes da utilização de soluções aquosas de surfactante é a sua capacidade para aumentar a solubilidade dos solutos hidrofóbicos que possuem normalmente baixa solubilidade em água. Esta solubilização é uma consequência da presença de domínios hidrofóbicos nos agregados de surfactante, os quais actuam como um microambiente para os compostos hidrofóbicos.^[44]

Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a actividade do surfactante é a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a concentração mínima de surfactante necessária, a uma dada temperatura, para as micelas se formarem. Esta concentração crítica reflecte o equilíbrio entre a interacção hidrofóbica da região de hidrocarbonetos das moléculas de surfactante e dos efeitos repulsivos electrostáticos das “cabeças” hidrofílicas destas moléculas. Abaixo desta concentração, as moléculas de surfactante estão presentes como monómeros livres em solução, e adsorvem à interface líquido-ar com a sua região de hidrocarbonetos orientada para fora da solução. Na região da CMC, a estrutura água-surfactante é alterada e as moléculas de surfactante começam a construir as suas próprias estruturas, existindo assim a formação espontânea de micelas.

A micela esférica é a estrutura mais comum formada pelos surfactantes. Contudo, os surfactantes podem associar-se numa variedade de estruturas em soluções aquosas: micelas elipsoidais, cilíndricas ou em forma de disco, bicamadas e vesículas. A

extraordinária variedade do comportamento dos surfactantes em solução pode ser alargada pela inclusão de aditivos ou co-surfactantes.^[45]

A CMC é determinada pela medição das tensões superficiais em séries de diferentes concentrações de surfactante. Inicialmente a quantidade de moléculas de surfactante aumenta na superfície da água. Durante esta fase a tensão superficial vai decrescendo com o aumento do logaritmo da concentração de surfactante. Quando a CMC é atingida, isto é, quando a superfície está saturada com moléculas de surfactante, a tensão superficial permanece constante com o aumento do logaritmo da concentração de surfactante. A curva que exemplifica este andamento está representada na figura 1.5.

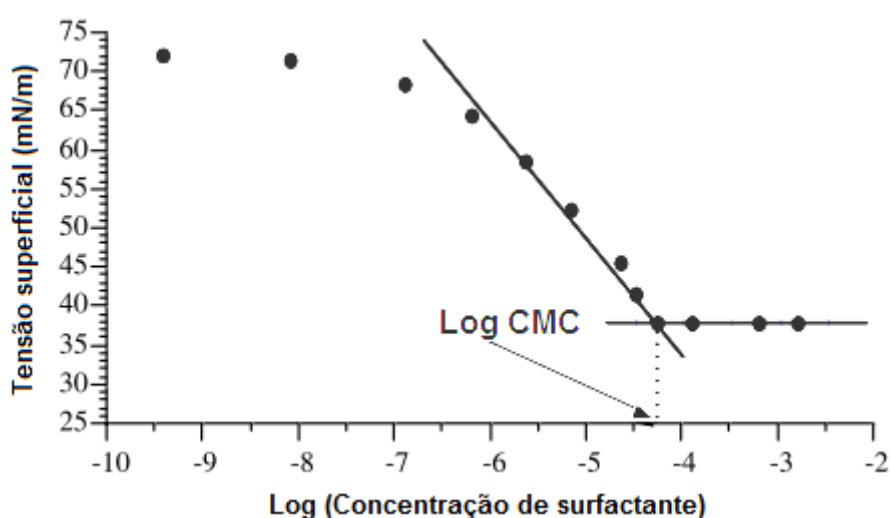


Figura 1.5: Representação da curva da tensão superficial em função do logaritmo da concentração de surfactante.

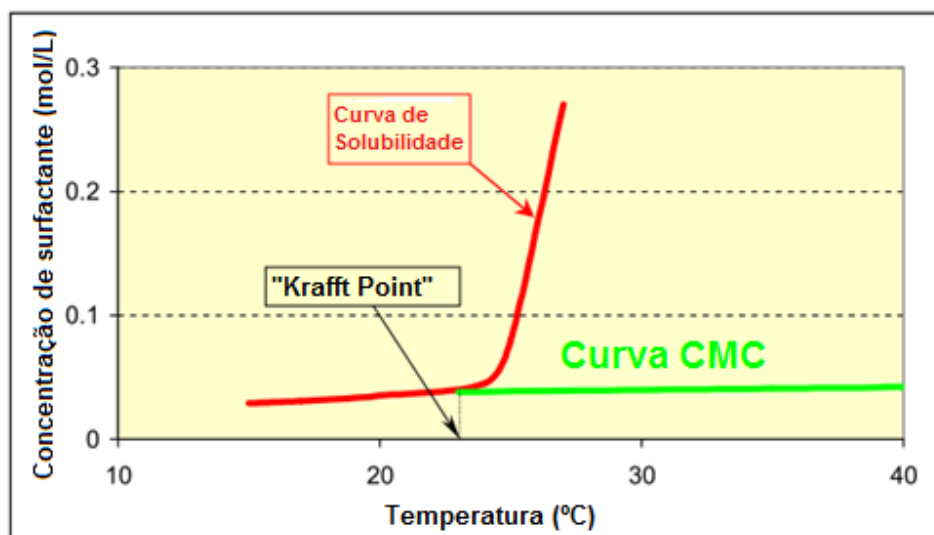
Uma baixa CMC normalmente é produzida através do aumento da massa molecular da parte lipofílica (hidrofóbica) da molécula, da diminuição da temperatura, e da adição de um electrólito.

Para a formação das miniemulsões pode ser utilizada uma vasta gama de surfactantes, sendo eles classificados de iónicos, que inclui os catiónicos e os aniónicos, e de não iónicos (ver exemplos de surfactantes na tabela 1.1).

Tabela 1.1: Exemplos de surfactantes catiónicos, aniônicos e não iônicos.

Surfactantes Catiónicos	Surfactantes Aniônicos	Surfactantes Não Iônicos
Brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB)	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Lutensol
Brometo de cetiltrimetilpiridina (CpyrB)	Oleato de potássio (Sabão)	Tween 20
Cloreto de dimetildioctadecilamónio	Dioctil sulfosuccinato de sódio (AOT)	Triton X-100

As solubilidades dos surfactantes demonstram um forte aumento acima de uma determinada temperatura, esta temperatura é designada por “Krafft point”. O conceito de “Krafft point” tem sido aplicado extensivamente a surfactantes iónicos, mas é raramente observado em surfactantes não iónicos. No “Krafft point”, a solubilidade do surfactante é igual à sua CMC, como se pode observar na figura 1.6. Acima do “Krafft point”, a solução torna-se clara e a solubilidade total aumenta drasticamente devido à formação das micelas. Pelo contrário, abaixo do “Krafft point”, esta solução é turva e tem uma solubilidade baixa.^{[46],[47]} É importante então, baixar o “Krafft point” para existir uma utilização prática dos surfactantes.

**Figura 1.6:** Representação do “Krafft point” numa curva de solubilidade do surfactante.

A adição de sais baixa a CMC, e aumenta a actividade de superfície do surfactante. Contudo, a adição de sal não altera os “Krafft points” dos surfactantes iónicos, permanecendo estes elevados.^[48]

A solubilidade dos surfactantes não iónicos decresce com o aumento da temperatura e os surfactantes começam a perder as suas propriedades activas de superfície acima da temperatura de transição, referida como ponto “cloudy”. Isto ocorre porque acima do ponto “cloudy” existe uma separação de fases, fase diluída em surfactante (solução aquosa contendo monómeros de surfactante ou micelas) e fase rica em surfactante. Esta transição é visível devido a um aumento significativo da turbidez da solução.^[46]

1.5.2 Líquidos iónicos como surfactantes

Os LIs são compostos constituídos por um anião e um catião, e possuem excelentes propriedades físico-químicas, como por exemplo elevada solubilidade para uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos, ponto de fusão abaixo dos 100°C e pressão de vapor muito baixa ou mesmo ínfima.^[49] A utilização destes compostos apresenta assim um benefício ecológico (não emissão de compostos orgânicos voláteis). Para além destas características, os LIs também não são inflamáveis e apresentam elevada estabilidade térmica, química e electroquímica.^{[50],[51]} Adicionalmente, o aumento das velocidades de reacção obtidas em LIs permite a redução dos volumes de solvente num dado processo tecnológico e consequentemente permite a redução de custos, riscos e possíveis desperdícios.^[45]

Muitos LIs podem ser criados por diferentes combinações do catião e do anião.^[49] Devido a esta capacidade de modificação dos LIs, estes representam uma classe única de “surfactantes desenhados” nos quais os substituintes da parte hidrofílica podem ser bastante variados. Contudo, a maioria das publicações no que concerne à formação de emulsões em LIs baseia-se acima de tudo na capacidade que estes líquidos possuem em suportar a auto-agregação dos surfactantes, que estava limitada a apenas alguns solventes, normalmente a água. A formação de micelas utilizando surfactantes comuns em LIs, nomeadamente o nitrato de etilamónia (NEA), foi descrita em 1982 por Evans *et al.*^[52], e recentemente é que têm sido desenvolvidos mais estudos sobre a utilização de LIs como surfactantes. Mais precisamente, um dos primeiros estudos que descreve a síntese de LIs surfactantes utilizados na formação de microemulsões foi desenvolvido por Texter *et al.*^[53] Os LIs desenvolvidos por este grupo apresentam na

sua estrutura, um grupo polar catiónico consistindo num anel imidazol e uma cauda hidrofóbica, como está exemplificado na figura 1.7.

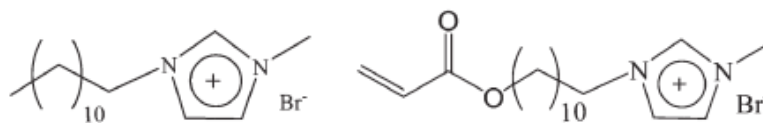


Figura 1.7: Estrutura de LIs surfactantes.^[53]

Até ao momento mais de 20 LIs têm sido descritos na literatura^[54] para formação de agregados em soluções aquosas.

No entanto, é necessário um maior conhecimento do comportamento de agregação para perceber de uma forma mais pormenorizada de que forma os LIs participam numa mistura de sistema de solventes. Por esse motivo, o estudo das interações da superfície e da interface é essencial para perceber as propriedades micelares, aplicações técnicas e impactos ambientais dos LIs. A concentração micelar crítica (CMC) é um factor importante na caracterização dos compostos anfifílicos. A formação das micelas deve-se à natureza dos iões constituintes dos LIs, os quais contêm geralmente, domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. A CMC está dependente do tamanho relativo desses domínios. Um domínio hidrofóbico grande resultará numa CMC mais baixa.^[55]

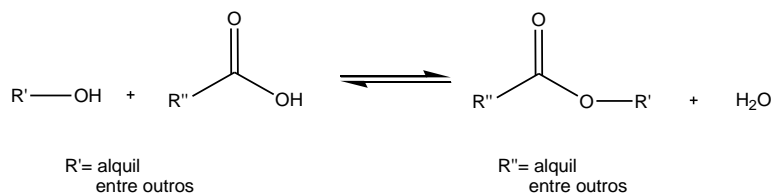
As micelas formadas por LIs normalmente exibem valores de CMC mais baixo do que os exibidos por surfactantes catiónicos tradicionais que apresentam uma estrutura similar. Este facto permite o desenvolvimento de aplicações que utilizam baixas quantidades de LI surfactantes, possibilitando maiores vantagens ambientais.^[54]

1.6 Biocatálise em Meios Não Convencionais

1.6.1. Solventes orgânicos

Antigamente, pensava-se que os biocatalisadores apresentavam actividade apenas em soluções aquosas e em condições suaves mas posteriormente verificou-se por diversos estudos que as enzimas não são tão sensíveis como se esperava. As enzimas conseguem funcionar com elevada eficiência em condições adversas, como pHs, temperaturas e pressões extremas, elevadas concentrações salinas, ou na presença de outros aditivos.^[56] Em 1985, Klibanov *et al.*^[57] verificou que as enzimas possuem actividade catalítica em solventes orgânicos permitindo assim a biocatálise em meios não aquosos. As enzimas mantêm a sua actividade e apresentam propriedades catalíticas interessantes, como elevada termoestabilidade e estereoselectividade, em meios não convencionais, como por exemplo: solventes orgânicos, sistemas de duas fases aquosas, sistemas de uma fase aquosa e orgânica, meio sólido, gases e fluídos supercríticos.^[56]

Uma das reacções mais importantes catalisadas por enzimas em meios não convencionais é a esterificação. A reacção de esterificação de um ácido com um álcool é uma reacção de equilíbrio (ver esquema 1.3), em que esta se pode deslocar no sentido da formação de produto (éster) na ausência de água. Esta reacção é portanto, termodinamicamente pouco favorável em meios aquosos convencionais.^[58]



Esquema 1.3: Reacção de esterificação.

Os solventes orgânicos oferecem novas possibilidades na biocatálise, apresentando a sua utilização diversas vantagens:^[56]

- (1) Maior solubilidade dos substratos hidrofóbicos, aumentando a produtividade volumétrica da reacção;
- (2) Realização de reacções termodinamicamente instáveis em água, existindo um deslocamento do equilíbrio da reacção no sentido da síntese e não da hidrólise. Este deslocamento é possível através da alteração da partição substrato/produto ou redução da actividade da água (a_w);

- (3) Recuperação facilitada do produto e da enzima, devido ao baixo ponto de ebulição dos solventes orgânicos utilizados. A enzima não se dissolve neste tipo de solventes e pode ser facilmente recuperada de uma mistura reaccional por filtração, enquanto o produto pode ser facilmente obtido por evaporação do solvente;
- (4) Aumento da termoestabilidade da enzima, particularmente quando são utilizados meios microaquosos e a capacidade de manipular a estereo- e regioselectividade da enzima neste tipo de meios.

A utilização de solventes orgânicos em reacções enzimáticas, obviamente não apresenta apenas vantagens, evidenciando a sua utilização algumas desvantagens, como por exemplo, na maioria dos casos a actividade catalítica em solventes orgânicos é mais baixa do que em soluções aquosas, devido às limitações difusionais, mudanças na conformação da enzima, ou desestabilização da própria enzima. Os solventes orgânicos podem mesmo desnaturar ou inibir a enzima.

As enzimas que são activas em solventes orgânicos mantêm a sua estrutura nativa quando são transferidas de meios aquosos para solventes orgânicos. Contudo, é essencial adicionar pequenas quantidades de água para manter a estabilidade e flexibilidade da enzima neste tipo de solventes, visto que a enzima em meio anidro está inactiva devido à sua alteração conformacional. A água acaba por funcionar como lubrificante da enzima, permitindo que esta mantenha a sua actividade. No entanto, se existir elevada quantidade de água num meio a enzima sofre uma desnaturação. Torna-se assim necessário saber a quantidade óptima de água para o bom funcionamento da enzima. Para quantificar a quantidade de água presente numa mistura reaccional, utiliza-se uma medida designada por actividade de água termodinâmica (a_w). A actividade de água óptima não é apenas importante para manter a actividade catalítica de uma enzima, mas também para obter elevada velocidade e elevado rendimento de reacção, e estabilidade da enzima.^[12]

Outro problema associado ao uso de solventes orgânicos é a remoção do solvente orgânico residual após a reacção. Os solventes orgânicos têm um elevado impacto ambiental devido à sua volatilidade, toxicidade e inflamabilidade.^[59]

1.6.1. Miniemulsões

Os sistemas de miniemulsões são dos sistemas verdes mais desenvolvidos para a ocorrência de reacções de esterificação. Neste sistema, o solvente principal utilizado é a água, constituindo uma das principais alternativas à utilização de solventes orgânicos. A utilização de água apresenta algumas vantagens relativamente a este tipo de solventes, nomeadamente é mais barata, segura e ambientalmente benigna. Os reagentes não necessitam de ser secos, não sendo necessário utilizar agentes desidratantes e gastar tanto tempo e tanta energia.^{[60],[61],[62]}

O sistema de miniemulsões tem merecido particular atenção como meio para a realização de reacções catalisadas por enzimas devido às suas propriedades interessantes como hospedeiro de biocatalisadores.^[63]

A primeira reacção de esterificação em miniemulsões foi descrita em 2001 por Kobayashi *et al.*^[60], utilizando ácidos carboxílicos e 3-fenil-1-propanol (álcool primário) como substratos orgânicos e um catalisador ácido de Bronsted para a catálise desta reacção em água. A utilização deste catalisador ácido, que funciona também como surfactante, e dos substratos orgânicos em água possibilita a formação destas emulsões cujo interior é hidrofóbico. A utilização deste sistema de emulsões permite que as moléculas de água formadas durante a reacção sejam removidas do interior das gotículas devido à natureza hidrofóbica do interior destas, permitindo uma aceleração da formação do éster e promovendo o equilíbrio no sentido da formação do produto sem necessidade de adição de agentes desidratantes, estando portanto aqui presente uma reacção de desidratação^{[60],[61],[62]} tal como está representado na figura 1.8.

Este estudo permitiu a obtenção de conversões de 80% utilizando ácido láurico e 3-fenil-1-propanol.

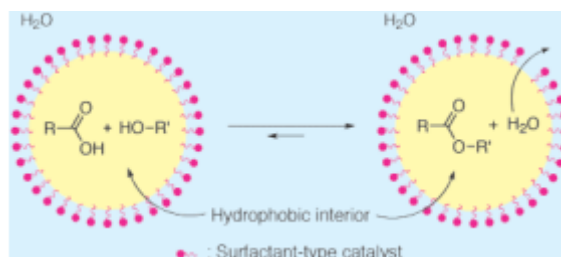
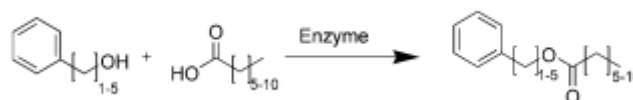


Figura 1.8: Reacção de esterificação em sistemas de miniemulsões directas.^[60]

A utilização de enzimas, como alternativa aos catalisadores químicos, em reacções de esterificação de desidratação utilizando água como meio contínuo também

tem sido bastante estudada, neste caso por parte do grupo de Lanfester *et al.*^[61], que procedeu a diferentes reacções de esterificação catalisadas por diferentes enzimas, utilizando ácidos carboxílicos de tamanho diferentes e também álcoois fenólicos (álcoois primários) com cadeias alquílicas de tamanho diferentes (ver esquema 1.4).



Esquema 1.4: Representação geral das reacções de esterificação enzimáticas estudadas por Landfester *et al.*^[61]

Obtiveram para diferentes ácidos carboxílicos conversões bastantes elevadas entre 70 e 80%, à temperatura de 40°C utilizando a lipase PS “Amano”, mas com velocidades reaccionais diferentes, como se pode observar no gráfico 1.1. O ácido nonanóico é o que apresenta a maior velocidade de reacção atingindo uma conversão máxima de 78% em 6h. Os ácidos decanóico e dodecanóico apresentam valores mais baixos de velocidade reaccional e atingem a conversão máxima de 80% após 7-8h de reacção. O ácido undecanóico atinge a conversão máxima de 80% após 47h de reacção, enquanto os ácidos com cadeia mais curta, o heptanóico e octanóico atingem 70% de conversão máxima após 60h de reacção.

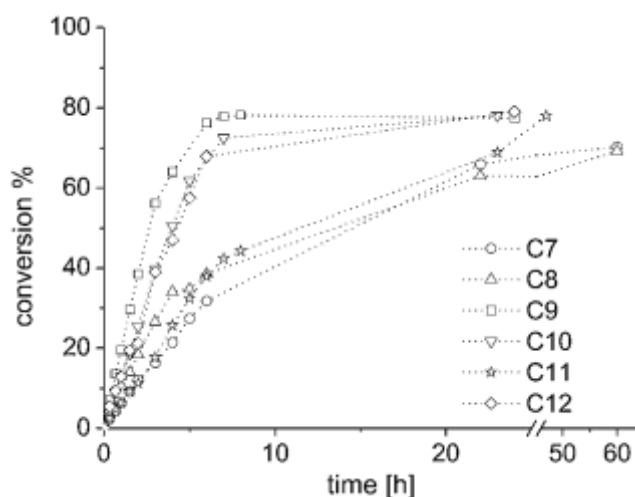
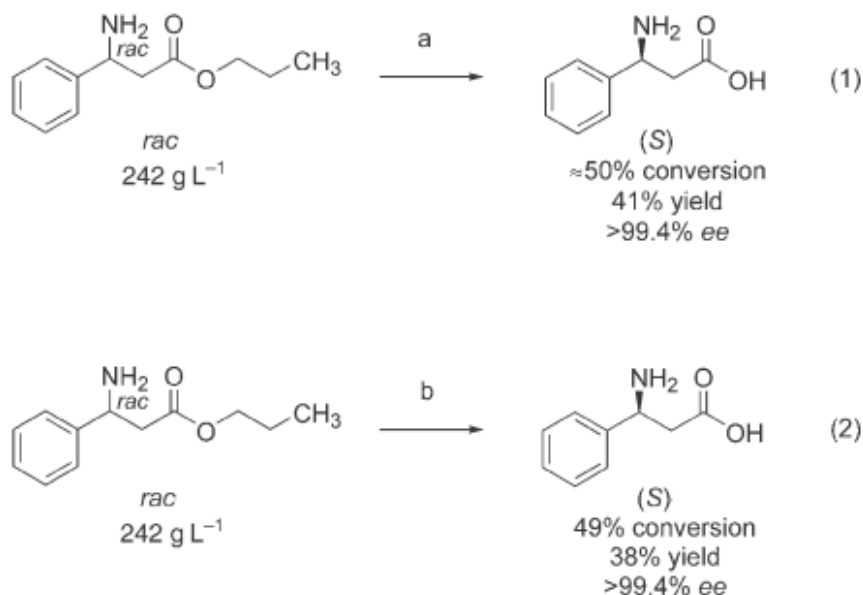


Gráfico 1.1: Conversão em função do tempo da reacção do 3-fenil-1-propanol com ácidos carboxílicos lineares com comprimentos de cadeia de C7-C12 na presença da Lipase PS “Amano”.^[61]

Como se pode verificar, o sistema de miniemulsões permite a obtenção de resultados bastante promissores no que concerne às reacções de esterificação. Contudo

ainda não existe um estudo muito pormenorizado relativamente às reacções enzimáticas enantioselectivas. O primeiro artigo a referir este tipo de reacções em sistemas de miniemulsões foi também escrito pelo grupo de Landfester *et al.*^[36], que propôs a utilização deste tipo de sistemas para a preparação de β -aminoácidos enantiomericamente puros a partir da hidrólise enantioselectiva de ésteres n-propílicos de β -aminoácidos racémicos. Primeiramente utilizaram um sistema de duas fases $H_2O/MTBE$ para a reacção representada no esquema 1.5 [eq. (1)], onde utilizaram como substrato o éster n-propílico β -fenilalanina, e obtiveram uma conversão de aproximadamente 50% em 15h de reacção utilizando uma concentração de 242g/L de substrato. Obtiveram também um valor de excesso enantiomérico superior a 99,4% para o β -aminoácido opticamente activo, o (S)- β -fenilalanina.

Esta mesma reacção também foi realizada em sistemas de miniemulsões, e verificaram que a velocidade da reacção de hidrólise foi significativamente superior atingindo uma conversão de aproximadamente 49% após 6h de reacção. Nesta reacção obtiveram também um valor de excesso enantiomérico superior a 99,4% para o (S)- β -fenilalanina, como se pode observar no esquema 1.5 [eq. (2)].



Esquema 1.5: Reacção num sistema de duas fases [eq. (1)] e num sistema de miniemulsões [eq. (2)], utilizando uma concentração de substrato de 242g/L. A enzima utilizada foi a lipase PS “Amano”.^[36]

Esta metodologia provou ser bastante eficiente na obtenção de β -aminoácidos enantiomericamente puros atingindo estes compostos valores de excesso enantiomérico superiores a 99%.

1.7 Novos Agentes Acilantes Iônicos utilizados na resolução cinética enzimática de álcoois secundários

A utilização de agentes acilantes iônicos na resolução cinética enzimática de álcoois secundários foi descrita anteriormente por Lourenço *et al.*^[7]. Estes agentes acilantes possuem duas partes distintas (ver figura 1.9), uma parte iónica e uma parte que contém um grupo éster que permite a resolução cinética enzimática dos álcoois secundários como também permite a separação do produto formado (éster formado através de uma reacção de transesterificação) do álcool que não reage.

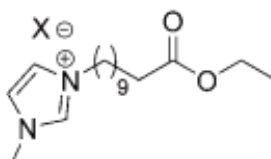
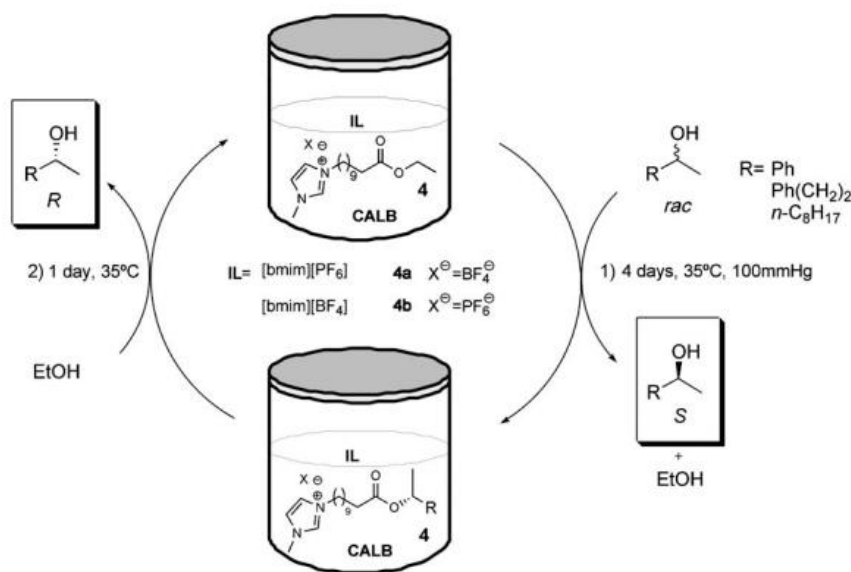


Figura 1.9: Estrutura dos agentes acilantes iónicos.

Este processo apresenta um elevado potencial relativamente a outros, porque através da utilização de apenas 1 equivalente de agente acilante é possível a separação de ambos os enantiómeros de uma mistura racémica.

Para o desenvolvimento desta metodologia (ver esquema 1.6), o grupo de Lourenço *et al.*^[7], utilizou como solventes da reacção, líquidos iónicos ([bmim][BF₄] e [bmim][PF₆]).



Esquema 1.6: Metodologia para a resolução cinética enzimática e separação de álcoois secundários, utilizando agentes acilantes iónicos e a enzima CALB.^[7]

Os LIs ao serem imiscíveis em alguns solventes orgânicos permitem a separação do álcool que não reage ((S)-álcool)) através de uma extracção repetida com solvente orgânico, o éter dietílico (passo 1). Por sua vez, o produto formado (enantiómero ancorado ao agente acilante) pode ser recuperado no passo 2, através de uma reacção de transesterificação enzimática utilizando um álcool primário, o etanol.

A utilização desta nova metodologia permitiu a obtenção de bons valores de rendimentos e de excessos enantioméricos para os enantiómeros R e S (ver tabela 1.2). Os melhores resultados foram obtidos para o agente acilante iónico com contra ião BF₄, utilizando como LI o [bmim][PF₆].

Tabela 1.2: Valores de rendimentos e excessos enantioméricos obtidos após a resolução cinética enzimática e separação de enantiómeros, utilizando CALB L.^[7]

Racemic alcohol	Acylating agent	IL ^[b]	Step 1: S enantiomer			Step 2: R enantiomer		
			t [h]	yield [%]	ee [%] ^[c]	t [h]	yield [%]	ee [%] ^[c]
R = Ph	4a	[bmim][PF ₆]	48	67.0	54.5	24	25.9	88.9
			96 ^[d]	68.8	62.2	24	22.5	98.5
	4b	[bmim][PF ₆]	96 ^[d]	51.0	80.9	24	41.3	99.3
	4a	[bmim][BF ₄]	96 ^[d]	74.3	56.2	24	19.2	98.9
	4a	—	48	64.5	39.4	24	19.4	99.0
R = Ph(CH ₂) ₂	4a	[bmim][PF ₆]	96	50.5	62.4	24	33.2	96.4
	4b	[bmim][PF ₆]	96	51.6	60.0	24	30.6	91.9
R = <i>n</i> -C ₈ H ₁₇	4b	[bmim][PF ₆]	96	51.5	38.5 ^[e]	24	25.0	96.5 ^[e]

De acordo com estes resultados, pode-se verificar que a utilização de agentes acilantes iónicos em LIs permite a obtenção de resultados bastante promissores, evidenciando que estes agentes podem ser utilizados com sucesso na resolução cinética enzimática de álcoois secundários e na sua separação.

CAPÍTULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

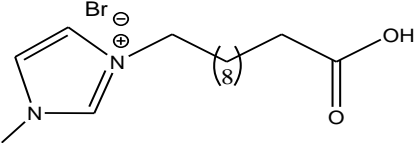
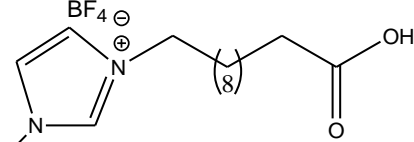
- **Biocatalisadores:** Utilizei dois catalisadores biológicos durante o trabalho experimental que foram: a enzima lipase B de *Candida antarctica* (Lipozyme CALB L) e uma enzima Lipase PS “Amano”, produzida a partir de uma cultura única de uma estirpe seleccionada pertencente à *Burkholderia cepacia*.

- 1-feniletanol ($\geq 98\%$), 2-heptanol ($\geq 99\%$), 2-decanol ($> 98\%$), éter diisopropílico ($\geq 98\%$) e MTBE (éter metil t-butilico) ($\geq 98\%$), da Fluka. Ácido octanóico ($\geq 99\%$), ácido-11-bromoundecanóico ($\geq 99\%$), álcool benzílico ($> 99\%$), 2-pentanol (98%), 2-octanol (97%), etilcaprilato ($> 99\%$) e n-hexadecano ($\geq 99\%$), da Sigma-Aldrich. Lutensol AT50 (poli (etilenoóxido)-hexadeciléter), da BASF. Acetonitrilo (99,99%) utilizado no HPLC e diclorometano (99,99%), da Fisher Scientific. Decano ($> 99\%$) e Sílica Gel 60 utilizada nas extracções orgânicas, da Merck. Ácido Fosfórico (85%) da Riedel de Haën. Éter dietílico (99,5%), da Panreac. Hexano e Tolueno da Valente e Ribeiro. Laurato de 1-feniletilo preparado pelo Dr. Nuno Lourenço.

- Solução de H_3PO_4 10^{-4}M : Preparada através da diluição de 1:100 de uma solução de H_3PO_4 10^{-1}M , que foi preparada adicionando 338 μL de H_3PO_4 a um balão volumétrico de 50mL perfazendo-se com água o volume do balão.

- Utilizei os seguintes agentes acilantes surfactantes iónicos, que foram preparados pelo Dr. Nuno Lourenço:

Tabela 2.1: Representação das estruturas dos diferentes agentes acilantes surfactantes iónicos.

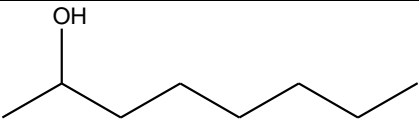
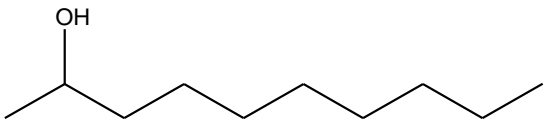
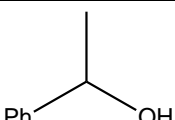
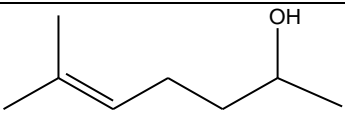
Nome do composto	Estrutura Molecular	Números para identificação
Brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio		1
Tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio		2

Diocil sulfossuccinato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio		3
Brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio		4
Hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio		5
Tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio		6
Diocil sulfossuccinato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio		7
Brometo de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio		8
Hexafluorofosfato de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio		9

- Utilizei os seguintes álcoois como substratos:

Tabela 2.2: Representação das estruturas dos diferentes álcoois.

Nome do composto	Estrutura Molecular	Números para identificação
Álcool benzílico		10
2-pentanol		11
2-heptanol		12

2-octanol		13
2-decanol		14
1-feniletanol		15
Sulcatol		16

2.2 Secção Experimental

- Cálculo da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para o cálculo das concentrações micelares críticas dos diferentes surfactantes utilizados, foi necessário medir as tensões superficiais em séries de diferentes concentrações de surfactante. Esta medição das tensões superficiais foi possível recorrendo a um Tensiómetro K8, da Kruss, e foi realizada à temperatura ambiente.

- Formação das miniemulsões

Para a sonicação utilizou-se um sonicador Bandelin Sonoplus, com uma ponta MS73. O tempo total de sonicação corresponde a 2 min e a amplitude a 60%. Para este tempo total de sonicação, o ultrassons foi aplicado em pulsos de 5s com 10s de pausa. Durante a sonicação, a macroemulsão estava num banho de gelo.

- Caracterização Microscópica

A obtenção de imagens das miniemulsões formadas utilizando diferentes agentes acilantes foi possível através da utilização de um microscópio da marca Leica, cujo modelo é o DMLB. Em algumas soluções utilizou-se o corante vermelho do Nilo e foi possível observar, por microscopia por fluorescência (Isolated EBQ 100), miniemulsões. O corante vermelho do Nilo, 9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazina-5-ona, é um composto fluorescente fortemente influenciado pelas condições ambientais.^[64] Este corante é uma molécula heterocíclica não carregada, sendo bastante

solúvel em solventes orgânicos e lípidos, mas relativamente insolúvel em água. O vermelho do Nilo actua como uma sonda hidrofóbica, isto é, a sua fluorescência máxima varia dependendo da hidrofobicidade relativa do meio.^[65]

Para a obtenção das imagens por microscopia utilizaram-se as objectivas de 200x e 500x.

- *Análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)*

A separação do álcool benzílico e do 1-feniletanol foi efectuada num HPLC, Merck Hitachi. O eluente utilizado foi acetonitrilo/água 90:10 com um fluxo de 0,5mL/min. A coluna utilizada foi uma RP (fase reversa) C18 [Microsorb 100 C18] com 25cm de altura e 0,46 cm de diâmetro interno, da Varian. Os compostos presentes nas diferentes amostras foram detectados utilizando um detector UV L-4000 (da Merck Hitachi) com um comprimento de onda de 258nm. Nestas condições, os tempos de retenção para o 1- feniletanol e para o octanoato de 1-feniletilo foram, de aproximadamente, 6,56min e 13,6min, respectivamente. Relativamente ao álcool benzílico e ao benziloctanoato, os tempos de retenção foram, de aproximadamente, 6,42min e 12,0min, respectivamente.

As conversões foram calculadas a partir das áreas dos picos respectivos (ver equação 2.1):

$$Convers\tilde{a}o\ (\%) = \frac{\text{Área (éster)}}{\text{Área (éster)} + \text{Área (álcool)}} \times 100$$

Equação 2.1: Equação utilizada para o cálculo das conversões.

Para a separação do 1-feniletanol também foi utilizado outro equipamento de HPLC, um Elite LaChrom, da VWR Hitachi, equipado com um amostrador automático, Autosampler L-2200. O eluente utilizado foi acetonitrilo/água 90:10 com um fluxo de 0,5mL/min. A coluna utilizada foi uma RP (fase reversa) C18 [Microsorb 100 C18] com 25cm de altura e 0,46 cm de diâmetro interno, da Varian. O 1-feniletanol presente nas diferentes amostras foi detectado utilizando um detector UV L-2400 com um comprimento de onda de 258nm. O tempo de retenção do 1-feniletanol foi de aproximadamente, 5,90min.

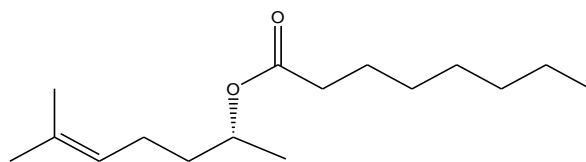
- *Análise por Cromatografia Gasosa (GC)*

A separação enantiomérica dos dois álcoois secundários, 1-feniletanol e sulcatol, foi feita num cromatógrafo gasoso Focus GC, da Thermo Finnigan, equipado com um detector por ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica astec chiraldex G-TA, da Astec, com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e revestida com um filme de espessura de 0,25µm. Utilizou-se apenas uma temperatura, de 100°C durante 15min, para a separação. O gás de arraste utilizado foi o azoto, a um caudal de 10mL/min. O injector e o detector encontram-se a uma temperatura de 250°C. Nestas condições, os tempos de retenção para os dois álcoois foram de, aproximadamente, 13,3min para o (S)-1-feniletanol e 13,8min para o (R)-1-feniletanol.

Posteriormente, também foi utilizado outro cromatógrafo gasoso, um GC-2010 Plus, da Shimadzu, equipado com um detector por ionização de chama (FID) e um amostrador automático. A separação da mistura reaccional foi feita numa coluna capilar quiral da Varian, cujo modelo é CP-Chirasil-DexCB, com 25m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e revestida com um filme de espessura de 0,25µm. Utilizou-se um programa de temperatura com uma rampa, sendo esta de 15°C/min, iniciando aos 80°C após 35min de corrida e terminando aos 180°C, continuando a corrida a esta temperatura durante 40min. O gás de arraste utilizado foi hélio, a um caudal de 100mL/min. O injector e o detector encontram-se a uma temperatura de 250°C. Nestas condições os tempos de retenção foram de, aproximadamente, 31,2min e 33,7min para o (R)-1-feniletanol e o (S)-1-feniletanol, respectivamente, 41,3min para o ácido octanóico e 47,4min para o (R)-octanoato de 1-feniletilo. Para o sulcatol, os tempos de reacção foram de aproximadamente, 11,2min e 11,6min para o (S)-sulcatol e para o (R)-sulcatol, respectivamente, 41,3min para o ácido octanóico e 45,3min para o (R)-octanoato de 1,5-dimetil-hex-4-enilo.

- *Caracterização por ¹H RMN*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram adquiridos num espectrómetro Brüker AMX300 (¹H 300MHz). Os desvios químicos são expressos em partes por milhão (ppm). A utilização de RMN foi importante para o cálculo da conversão de sulcatol.



(R)-Octanoato de 1,5-dimetil-hex-4-enilo

^1H RMN (CDCl_3) δ 4,90 (quadrupeto, 1H, $\text{CH}_2\text{CHOCH}_3$), 5,11 (tripeto, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CCHCH}_2$).

- Área (Sulcatol)= 0,992

- Área (R-Octanoato de 1,5-dimetil-hex-4-enilo)= 0,410

2.2.1 Procedimentos Experimentais

- Efeito da utilização de diferentes álcoois secundários na formação de miniemulsões.

Procedimento A:

Pesou-se 10mg (0,029mmol) de um agente acilante surfactante iônico, o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metilimidazólio, para um vial de 4mL e adicionou-se 1mL de H_2O , 4% de n-hexadecano (40 μL) e 56 μL de álcool secundário (2-heptanol, 2-octanol, 2-pentanol, 2-decanol e 1-feniletanol). Posteriormente, a mistura reaccional foi agitada durante 1h. A macroemulsão formada foi posteriormente sonicada.

Posteriormente retirou-se uma alíquota e colocou-se numa lamela para se observar as miniemulsões ao microscópio.

- Efeito da utilização de diferentes co-surfactantes na formação de miniemulsões.

Procedimento B:

Pesou-se 20mg (0,058mmol) de um agente acilante surfactante iônico, o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metilimidazólio, para um vial de 4mL e adicionou-se 2mL de H_2O , 14 μL de 1-feniletanol e 294 μL de álcool terc-amílico (utilizado como co-solvente para a uma maior solubilização do agente acilante que é bastante insolúvel em água). Esta mistura foi dividida em 3 vials de 4mL, ficando cada um com um volume de 700 μL . Em cada vial são adicionados volumes diferentes de co-surfactantes, 7 μL , 14 μL , 28 μL , correspondendo a 1, 2 e 4% (% v/v). Os compostos utilizados como possíveis co-surfactantes são os seguintes, n-hexadecano, tolueno, éter

diisopropílico, MTBE, hexano e decano. Seguidamente, a macroemulsão formada foi sonicada.

Posteriormente retirou-se uma alíquota e colocou-se numa lamela para se observar as miniemulsões ao microscópio.

- *Reacção enzimática em miniemulsões.*

Procedimento C:

Todas as reacções enzimáticas foram realizadas em tubos de plástico tipo falcon de 15mL.

Para a formação das miniemulsões utilizou-se 4g de 2% de uma solução aquosa de Lutensol AT50 em H_3PO_4 10^{-4}M . À solução de 2% de uma solução aquosa de Lutensol AT50 em H_3PO_4 10^{-4}M , adicionou-se 800mg de uma solução equimolar de dois componentes (ácido carboxílico ou éster e álcool) e 32mg de n-hexadecano. Posteriormente, este sistema de duas fases foi agitado durante 1h.

O pH reaccional, no que diz respeito à utilização de um substrato ácido, varia numa gama entre 3,5 e 4, no que diz respeito à utilização de um éster como substrato, varia numa gama entre 4,5 e 6. As medições de pH foram efectuadas num eléctrodo 702 SM Titrino da Metrohm.

Depois da ultrasonicação, adicionou-se 20mg de Lipase PS “Amano” para iniciar a reacção. O tubo de plástico tipo falcon com as miniemulsões formadas foi colocado num agitador orbital (Agitors 160E), com uma agitação de 250rpm e temperatura de 37°C . Foram retiradas amostras de $100\mu\text{L}$ depois de 20min, 1h, 1,5h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h, 48h, 72h e 96h de reacção, e adicionou-se 1mL de acetonitrilo. Posteriormente foram injectados $20\mu\text{L}$ destas amostras no HPLC, Merck Hitachi.

No caso da análise por GC, foram retiradas amostras de $100\mu\text{L}$ após certos períodos de tempo e procedeu-se a uma extracção orgânica com o intuito de se retirar na totalidade a água presente. Assim, aos $100\mu\text{L}$ adicionou-se 1mL de éter dietílico e agitou-se num vórtex. Esta solução foi posteriormente, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e eluída através de uma pipeta de Pasteur contendo sílica gel, e recolhida noutra tubo de plástico tipo falcon. Este procedimento foi repetido mais duas vezes mas sem adição de sulfato de sódio. Para uma amostra de $200\mu\text{L}$, utilizou-se 5mL em vez de 3mL de éter dietílico. Estes 5ml foram adicionados da seguinte forma: 2mL para a primeira

extracção orgânica, e 1ml para as últimas 3 extracções. Seguidamente, foi injectado no GC 1µL da mistura reaccional tratada.

- Remoção de 2% de 1-feniletanol do meio aquoso, utilizando diferentes percentagens de NaCl, 10, 20 e 30%.

Procedimento D:

Preparou-se uma solução de 2% (% p/v) de 1-feniletanol num balão volumétrico de 5mL, pesando-se 100mg de 1-feniletanol e perfazendo-se o volume do balão com água. Desta solução retirou-se 1mL para três vials de 4mL. Em cada vial são adicionadas quantidades diferentes de NaCl, 100mg, 200mg, 300mg, correspondendo a uma % (p/p) de 10, 20 e 30%. Retirou-se 100µL de cada vial e adicionou-se 900µL de acetonitrilo. Foram posteriormente injectados 10µL destas amostras no HPLC Elite LaChrom.

- Remoção do 1-feniletanol de uma mistura reaccional utilizando ácido octanóico como agente acilante.

Procedimento E:

Estudámos também a remoção do 1-feniletanol de uma mistura reaccional, que segue o procedimento C da secção experimental. Após 168h de reacção de esterificação, utilizando como agente acilante o ácido octanóico, colocou-se o tubo de plástico tipo falcon, que contém a mistura reaccional, a uma temperatura de 4°C. Depois de observarmos uma nítida separação de fases retirou-se 10µL da fase aquosa e adicionou-se a este volume, 990µL de acetonitrilo. Posteriormente foram injectados 10µL desta amostra no HPLC Elite LaChrom.

Seguidamente, adicionou-se 1,2g (30%) de NaCl ao falcon e colocou-se novamente o tubo de plástico tipo falcon a uma temperatura de 4°C. Adicionou-se este valor de NaCl porque a mistura contém cerca de 4mL de H₂O. Posteriormente, retirou-se 10µL da fase aquosa desta mistura, adicionou-se 990µL de acetonitrilo, e foram injectados 10µL desta amostra no HPLC Elite LaChrom.

CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

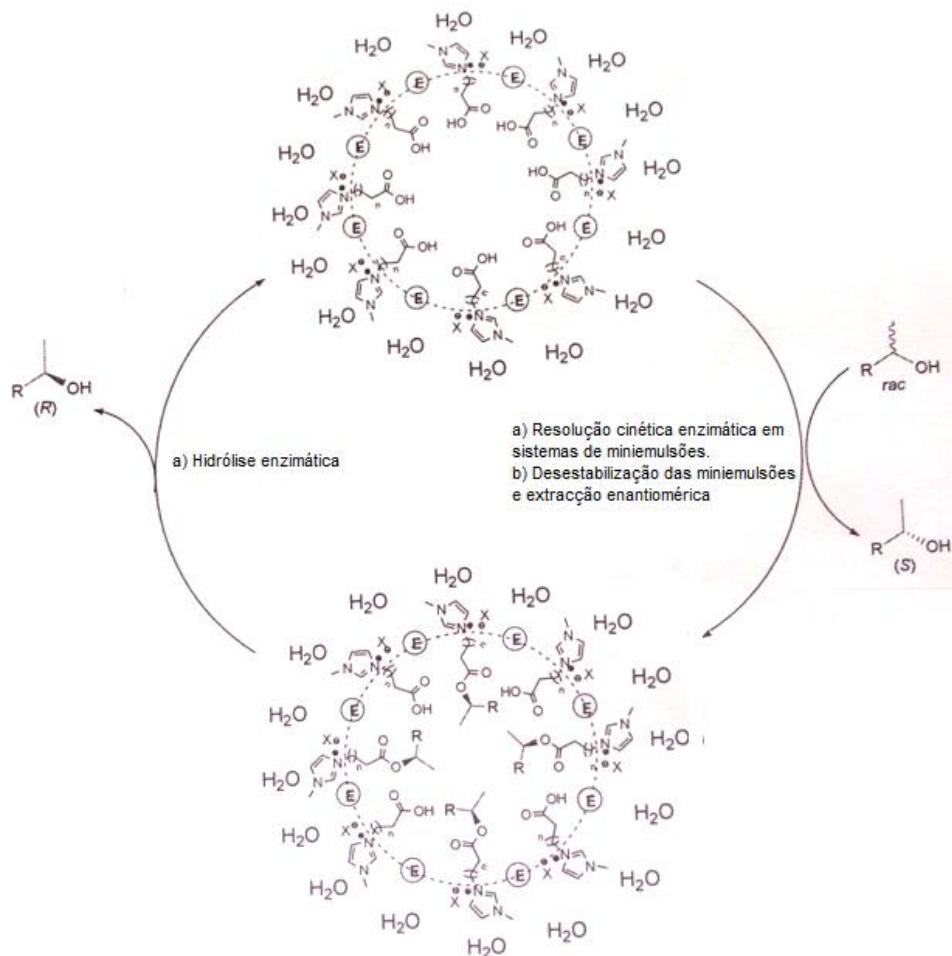
Este trabalho tem como objectivos o desenvolvimento de uma metodologia que permita a RCE de álcoois secundários em sistemas de miniemulsões e a posterior separação de ambos os enantiómeros de uma mistura racémica, bem como o estudo da utilização de AASIs na formação de miniemulsões e a sua aplicação na RCE de álcoois secundários.

Neste trabalho, a RCE é efectuada através de reacções de esterificação ou transesterificação enzimáticas, onde utilizámos como principal substrato limitante o 1-feniletanol, visto que, é dos álcoois modelo mais usados no estudo deste tipo de resoluções. Esta resolução apresenta algumas vantagens relativamente à química nomeadamente, maior velocidade de reacção, elevada enantioselectividade e processo ambientalmente mais seguro. Além disso, tal como foi referido anteriormente não existe muita informação descrita na literatura sobre a RCE de álcoois secundários em sistemas de miniemulsões, no entanto este processo apresenta um elevado potencial, na medida em que, a utilização de miniemulsões permite que o processo seja mais verde, tendo como uma das principais vantagens o uso de água como solvente principal não sendo necessário a utilização de solventes orgânicos.

A utilização de AASIs neste processo apresenta uma grande vantagem porque permite através do seu carácter acilante a ocorrência da reacção de esterificação ou transesterificação, e através do seu carácter surfactante a formação das miniemulsões. Outra propriedade bastante importante destes AASIs é que utilizando apenas um equivalente deste agente é possível a separação dos enantiómeros após a RCE, uma vez que, após a desestabilização das miniemulsões, o produto formado como possui um carácter iónico permanece na fase aquosa e o álcool que não reagiu forma uma fase orgânica. Posteriormente a esta separação de fases o (S)-1-feniletanol é removido e o éster na fase aquosa é posteriormente hidrolisado enzimaticamente, sendo possível a obtenção dos enantiómeros R e S, como se pode observar no esquema 3.1.

A remoção-separação dos enantiómeros foi planeada através de uma filtração por membranas de nano-filtração tendo em conta os diferentes pesos moleculares do álcool e do éster. Permitindo isolar o álcool (peso molecular mais baixo) no permeado e reter o éster na fase do retentado. A aplicação desta metodologia é bastante importante

porque de uma forma simples, eficaz, económica e limpa é possível a obtenção dos dois enantiómeros a partir de uma mistura racémica.



Esquema 3.1: Resolução cinética enzimática e separação de álcoois secundários em sistemas de miniemulsões compostos por AASIs.

Em primeiro lugar, para o desenvolvimento do nosso trabalho verificámos a concentração de AASI a utilizar na RCE dos enantiómeros, e para tal foi necessário proceder-se à determinação das concentrações micelares críticas (CMCs) destes agentes. Posteriormente, estudámos reacções de esterificação em sistemas de miniemulsões, utilizando como substratos limitantes o álcool benzílico e o 1-feniletanol, e também a influência da polaridade dos substratos acídicos neste tipo de reacções.

Seguidamente, estudámos a utilização de AASIs na resolução cinética enzimática do 1-feniletanol em sistemas de miniemulsões. Depois, utilizando ácido octanóico procedemos à RCE do 1-feniletanol e sua posterior separação. E, por fim realizámos uma RCE do sulcatol, utilizando também o ácido octanóico como agente acilante.

3.1 Cálculo das CMCs dos diferentes AASIs tanto na forma de ácidos como na forma de ésteres.

A determinação das CMCs é bastante importante porque, tal como foi referido na introdução, está directamente relacionada com a formação das miniemulsões.

No gráfico 3.1 estão representadas três curvas de tensões superficiais em função dos logaritmos das concentrações de AASIs (1, 2 e 3). Analisando este gráfico podemos verificar que a tensão superficial decresce linearmente à medida que aumenta o logaritmo da concentração de surfactante. Posteriormente verificamos que, deixa de existir esta linearidade, uma vez que, com o aumento do logaritmo da concentração não existe grande variação no valor da tensão superficial, permanecendo esta praticamente constante. Assim, através da intersecção das duas linhas rectas, correspondentes à secção dependente da concentração e à secção independente da concentração, é possível determinar a CMC de cada surfactante.

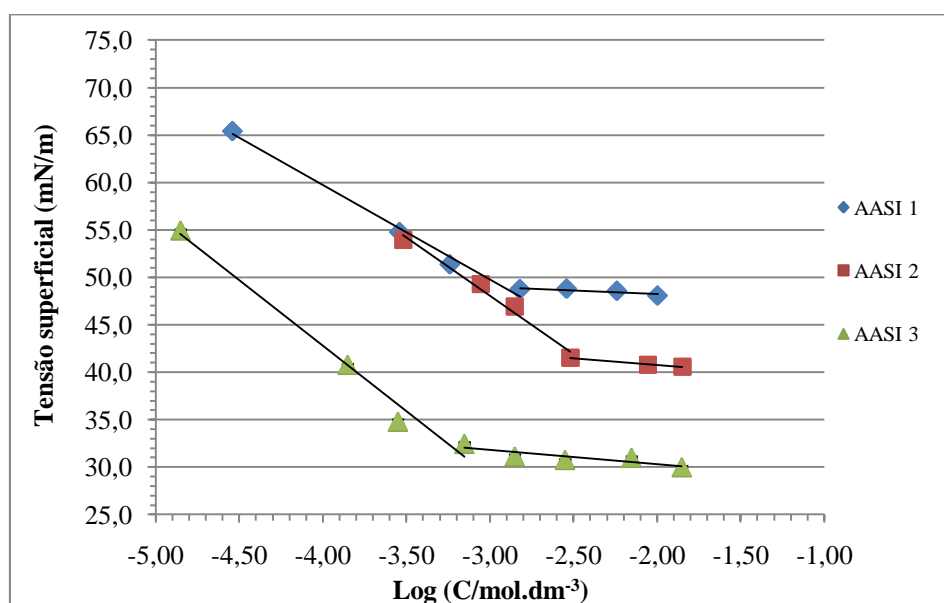


Gráfico 3.1: Representação gráfica da tensão superficial em função do logaritmo da concentração dos AASIs 1, 2 e 3.

Também se pode observar um comportamento semelhante a estas curvas para três dos cinco AASIs (4, 5, 6, 8 e 9), como está representado no gráfico 3.2, e dessa forma também é possível determinar através da intersecção das duas linhas rectas, correspondentes à secção dependente da concentração e à secção independente da concentração, as CMCs dos três ésteres que possuem o maior número de carbonos

(brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 4), hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 5) e tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 6)).

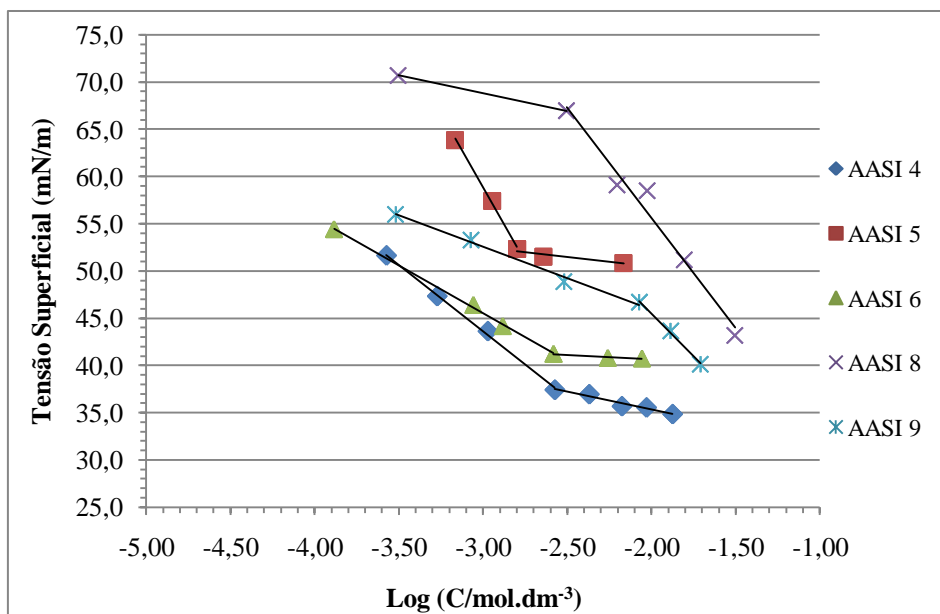


Gráfico 3.2: Representação gráfica da tensão superficial em função do logaritmo da concentração dos AASIs 4, 5, 6, 8 e 9.

Também se pode observar no gráfico 3.2, que existem duas curvas correspondentes aos AASIs (8 e 9) que apresentam um comportamento diferente ao apresentado pelas curvas correspondentes aos AASIs (4, 5 e 6). Mais precisamente, verifica-se que inicialmente a tensão superficial permanece praticamente constante com o aumento do logaritmo da concentração e depois verifica-se um decréscimo linear da tensão superficial com o aumento do logaritmo da concentração. Para justificarmos este comportamento, podemos dizer que inicialmente a tensão superficial permaneceu constante porque a concentração de surfactante não era suficiente para as moléculas de surfactante interagirem com a superfície do líquido e assim baixar a tensão superficial. Verificámos também que a adição de surfactante não foi suficiente para se atingir uma tensão superficial constante após o decréscimo acentuado desta, e assim não foi possível calcular a CMC para estes dois ésteres.

Os valores de CMCs dos seis AASIs (1-6) estão representados na tabela 3.1, tal como a gama de concentração que incluirá a CMC dos AASIs 8 e 9. Verificamos que, o dioctil sulfosuccinato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 3) é o surfactante que apresenta uma CMC mais baixa, e tal facto poderá dever-se à presença

do AOT como contra-íão. O AOT, como descrito na literatura, é um surfactante aniónico e, por esse facto poderá aumentar o carácter surfactante deste AASI. Também verificamos que o AASI 1 apresenta uma CMC mais baixa que o AASI 2 mas não se observa a mesma diferença entre os AASIs 4 e 6. Embora estes apresentem os mesmos contra-íões (Br e BF₄) dos AASIs 1 e 2. Relativamente ao AASI 5, este apresenta o valor mais baixo de CMC dos ésteres estudados.

A determinação dos valores das CMCs dos diferentes surfactantes permitiu-nos garantir que todo o trabalho realizado com estes surfactantes foi realizado acima da CMC. As CMCs obtidas apresentam valores relativamente baixos, o que demonstra a capacidade surfactante que a maioria destes agentes possui.

Tabela 3.1: Representação dos valores dos CMCs dos AASIs (1-6, 8 e 9)

	Surfactantes	CMC (mM)
Ácidos	<i>Brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 1)</i>	1,51
	<i>Tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 2)</i>	3,02
	<i>Diocetil sulfosuccinato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 3)</i>	0,702
Ésteres	<i>Brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 4)</i>	2,67
	<i>Hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 5)</i>	1,59
	<i>Tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 6)</i>	2,62
	<i>Brometo de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 8)</i>	> 31,0
	<i>Hexafluorofosfato de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 9)</i>	> 26,0

Depois de termos determinado os valores das concentrações de surfactantes necessários para a formação das miniemulsões, decidimos estudar alguns factores que podem influenciar a estabilização das miniemulsões, sendo um deles a utilização de co-surfactante e dessa forma pretendemos fazer um estudo mais aprofundado de diferentes compostos que podem funcionar como co-surfactantes, e o outro a utilização de diferentes álcoois secundários, que com suas diferentes solubilidades, podem afectar a estabilização das miniemulsões.

3.2 Estudo do efeito da utilização de diferentes álcoois secundários e diferentes co-surfactantes na formação de miniemulsões.

Com o intuito de se estudar mais pormenorizadamente o efeito de diferentes álcoois secundários na formação de miniemulsões seguiu-se o procedimento A da secção experimental, utilizando como álcoois secundários o 2-heptanol (**12**), o 2-octanol (**13**), o 2-pentanol (**11**), o 2-decanol (**14**) e o 1-feniletanol (**15**). Verificámos microscopicamente que não existem grandes diferenças na formação de miniemulsões apresentando todas as misturas reacionais uma elevada quantidade de miniemulsões que permanecem estáveis durante pelo menos 24h. As únicas diferenças que observámos ao microscópio são a presença de cristais quando se utiliza como álcool secundário o 2-pentanol (**11**) e a presença de partículas sólidas quando se utiliza como álcool secundário o 1-feniletanol (**15**) (ver figuras 6.1 e 6.5 em anexo). Macroscopicamente, o que se verificou foi que quando se utiliza o 1-feniletanol (**15**), começa a existir uma separação de fases após a mistura reaccional ser sujeita a 8 ciclos de ultrasons, evidenciando assim que o 1-feniletanol (**15**) influencia a estabilidade das miniemulsões. Mais precisamente, quando se utiliza esta quantidade de 1-feniletanol (**15**) este composto já não é solúvel em água e ocorre esta separação de fases, formando o 1-feniletanol (**15**) uma fase orgânica. Contrariamente ao que acontece com os compostos 2-heptanol (**12**), 2-octanol (**13**), 2-decanol (**14**) que apresentam uma muito baixa solubilidade em água e formam uma fase orgânica bastante estável, não existindo portanto separação de fases após as misturas reacionais compostas por estes álcoois serem sujeitas a ultrasons.

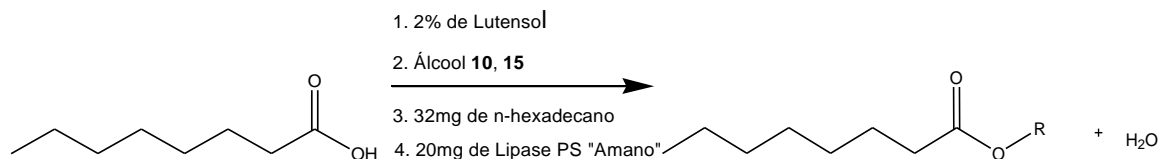
No que diz respeito ao estudo de diferentes compostos (n-hexadecano, tolueno, éter diisopropílico, MTBE, hexano e decano) que podem funcionar como possíveis co-surfactantes na formação de miniemulsões, seguiu-se o procedimento B da secção experimental. A utilização de co-surfactantes, como foi referido anteriormente, é bastante importante para a formação e estabilidade das miniemulsões, sendo essencial um estudo mais aprofundado de diferentes compostos hidrofóbicos para perceber qual a influência que estes podem apresentar na formação de miniemulsões. Dessa forma, verificámos microscopicamente que utilizando 1% destes compostos não houve formação de grande quantidade de miniemulsões (ver figura 6.6 em anexo), e que só quando se utilizaram percentagens acima de 1% (2% e 4%) de n-hexadecano, tolueno e decano (ver figuras 6.7 e 6.8 em anexo) é que se observou uma maior quantidade de

miniemulsões formadas apesar de se observar também cristais (provável do agente acilante utilizado). Tal facto pode dever-se à maior hidrofobicidade destes compostos relativamente ao éter diisopropílico, MTBE e hexano. Macroscopicamente, observámos também que o n-hexadecano é o único composto que permite uma maior estabilidade das miniemulsões durante pelo menos 24h e dessa forma é o composto que apresenta as melhores características para desempenhar o papel de co-surfactante.

Estes estudos foram importantes na medida em que, demonstraram que os álcoois secundários excepto o 1-feniletanol (**15**) permitem a formação de uma elevada quantidade de miniemulsões que permanecem estáveis durante pelo menos 24h e que a utilização do n-hexadecano como co-surfactante ajuda na estabilização destas mesmas miniemulsões.

3.3 Estudo da reactividade de dois álcoois diferentes, um álcool primário (álcool benzílico) e um álcool secundário (1-feniletanol).

Apesar de o 1-feniletanol (**15**) não permitir a formação de miniemulsões estáveis ao longo do tempo, este substrato é bastante utilizado em RCEs. Assim, pretendemos estudar a RCE do 1-feniletanol (**15**) em sistemas de miniemulsões, visto que, não existe muita informação sobre este tema na literatura. Devido a este facto, primeiramente pretendemos verificar se as reacções de esterificação ocorrem de forma eficiente em sistemas de miniemulsões e se estas miniemulsões permanecem estáveis ao longo do tempo. Dessa forma, tentámos reproduzir uma reacção de esterificação, utilizando como substratos modelos o ácido octanóico e o álcool benzílico (**10**), descrita na literatura pelo grupo de Landfester *et al.*^[61] E, posteriormente utilizando as mesmas condições aplicadas nesta reacção, estudámos uma reacção de esterificação em sistemas de miniemulsões, utilizando como substratos modelos o ácido octanóico e um álcool secundário, o 1-feniletanol (**15**). Para a realização das reacções de esterificação representadas no esquema 3.2 seguiu-se o procedimento C presente na secção experimental.



Esquema 3.2: Reacções de esterificação do ácido octanóico com o álcool benzílico (10) e com o 1-feniletanol (15), catalisadas pela Lipase PS "Amano".

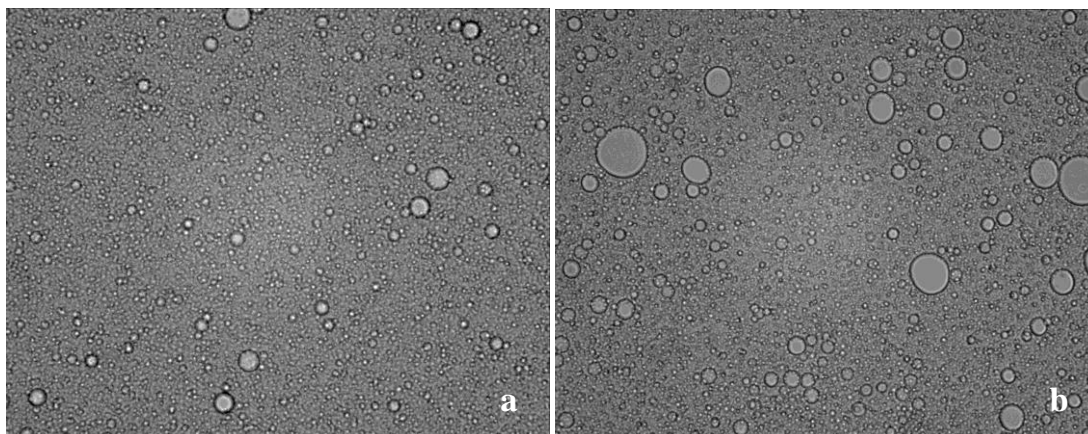


Figura 3.1: Imagens obtidas por microscopia com ampliação de 500x de uma mistura reaccional contendo 1-feniletanol (a) e álcool benzílico (b).

As conversões do álcool benzílico (**10**) e do 1-feniletanol (**15**), numa reacção de esterificação com o ácido octanóico, estão representadas no gráfico 3.3. Este estudo teve como objectivo reproduzir os resultados descritos na literatura por Landfester *et al.*^[61] relativamente ao álcool benzílico (**10**), que obteve um máximo de conversão de 70% para 24h de reacção, significativamente superior aos 58% obtidos por nós para o mesmo período de tempo. Os valores foram significativamente diferentes, e esta discrepância pode estar relacionada com o facto da nossa metodologia ainda não estar optimizada.

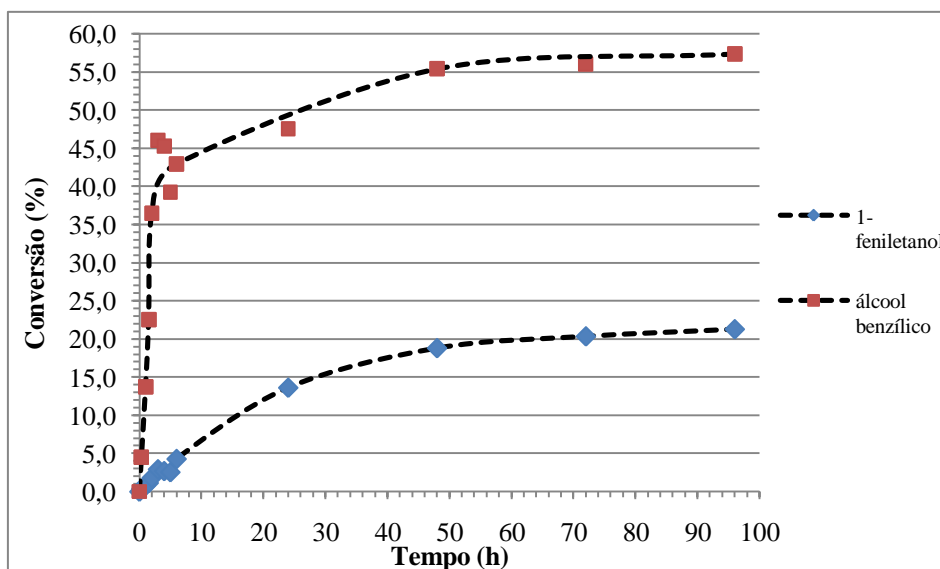


Gráfico 3.3: Representação gráfica das conversões de ambos os substratos, 1-feniletanol (**15**) e álcool benzílico (**10**) ao longo do tempo para reacções de esterificação com o ácido octanóico catalisadas pela Lipase PS “Amano”.

Comparando os resultados obtidos para este álcool com os resultados obtidos para o 1-feniletanol (**15**), podemos verificar através da análise do gráfico 3.3 que, o álcool benzílico (**10**) é o substrato que apresenta os valores de conversão mais elevados ao longo do tempo, atingindo um máximo de conversão de aproximadamente 58%. Relativamente ao 1-feniletanol (**15**), este atingiu aproximadamente 21% de conversão máxima.

Esta diferença tão significativa nas conversões de ambos os substratos, deve-se à diferença estrutural entre estes, sendo o álcool benzílico (**10**) um álcool primário e consequentemente, mais reactivo que o 1-feniletanol (**15**), que é um álcool secundário. Outro facto que pode justificar esta diferença, é que as emulsões formadas com o álcool benzílico (**10**) são mais estáveis ao longo do tempo do que as emulsões formadas com o 1-feniletanol (**15**). Mais precisamente, a mistura reaccional com o 1-feniletanol (**15**) começa a formar duas fases, 20 minutos após ser sujeita a 8 ciclos de ultrasons, enquanto a mistura reaccional com o álcool benzílico (**10**) apresenta uma única fase e uma cor leitosa ao longo do tempo. Microscopicamente, verificámos que utilizando estes dois álcoois existe formação de elevada quantidade de miniemulsões (ver figuras 3.1 (a) e (b)).

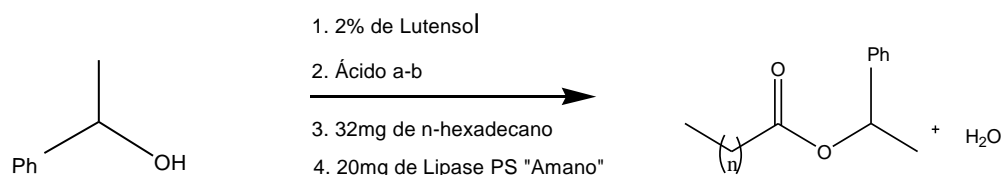
3.4 Estudo da utilização de dois agentes acilantes de tamanhos diferentes, ácido octanóico e ácido 11-bromoundecanóico, em reacções de esterificação com o 1-feniletanol.

A solubilidade dos substratos (ácidos carboxílicos e álcoois) na fase contínua aquosa poderá influenciar a velocidade da reacção de esterificação e a conversão final. Os substratos mais hidrofílicos localizar-se-ão na interface entre a gotícula e a fase aquosa, enquanto os substratos mais hidrofóbicos permanecerão no centro da gotícula. A água também pode difundir-se para as regiões mais hidrofílicas das gotículas favorecendo a reacção de hidrólise, tal como os substratos hidrofílicos podem difundir para a fase aquosa, não estando também disponíveis para a reacção de esterificação. O produto desta reacção (éster), que é o componente mais hidrofóbico do sistema, ficará acumulado no centro da gotícula e não interferirá com a interface desta e portanto não interferirá também com a acção da enzima.

Existem actualmente alguns estudos da influência do tamanho da cadeia do agente acilante realizados pelo grupo de Landfester *et al.*^[61], que demonstraram que a

reacção com o ácido nonanóico apresenta uma maior velocidade de reacção do que a reacção com o ácido heptanóico, visto que é mais hidrofóbico e permanece no centro da gotícula. Dessa forma, ao utilizarmos no nosso trabalho dois substratos acídicos com comprimentos de cadeia diferentes, em reacções de esterificação enzimática, pretendemos avaliar a influência da polaridade do substrato neste tipo de reacções em sistemas de miniemulsões.

Assim, realizámos a reacção de esterificação representada no esquema 3.3, onde se utilizaram o 1-feniletanol (**15**) e dois agentes acilantes o ácido octanóico e o ácido 11-bromoundecanóico, e onde se seguiu o procedimento C presente na secção experimental.



Esquema 3.3: Reacções de esterificação do ácido octanóico (a) e do ácido 11-bromoundecanóico (b) com o 1-feniletanol (**15**), catalisadas pela Lipase PS “Amano”.

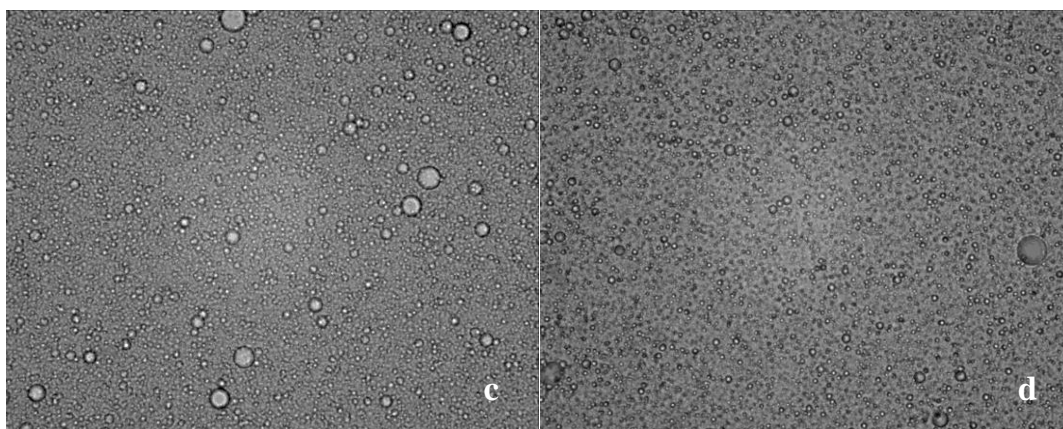


Figura 3.2: Imagens obtidas por microscopia com ampliação de 500x de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico (c) e ácido 11-bromoundecanóico (d).

As conversões obtidas do 1-feniletanol (**15**), utilizando o ácido octanóico e o ácido 11-bromoundecanóico como substratos acídicos em reacções de esterificação enzimática, estão representadas no gráfico 3.4.

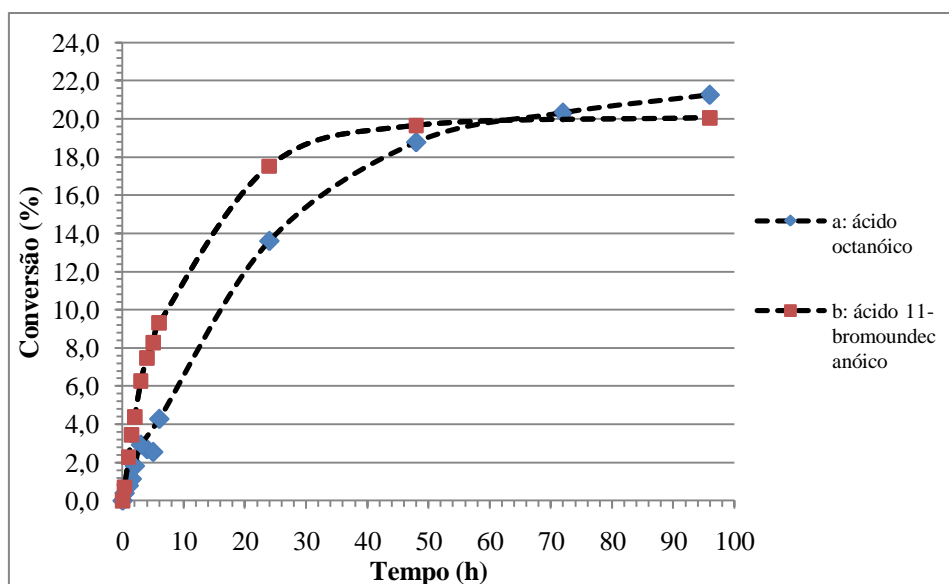


Gráfico 3.4: Representação gráfica das conversões de 1-feniletanol (**15**) em reacções de esterificação com o ácido octanóico (a) e o ácido 11-bromoundecanóico (b).

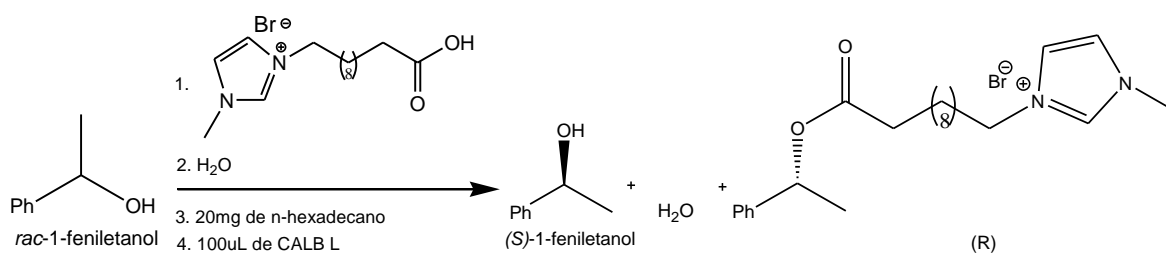
Verificámos através de uma análise a este gráfico que as duas curvas apresentam um comportamento semelhante, nomeadamente a reacção de esterificação em que é utilizado o ácido octanóico atinge uma conversão máxima de aproximadamente 21% após 96h e a reacção de esterificação em que é utilizado o ácido 11-bromoundecanóico atinge uma conversão máxima de aproximadamente 20% após 96h. Podemos dizer assim que, nesta reacção de esterificação em que é utilizado como substrato modelo o 1-feniletanol (**15**), o facto de se utilizar dois agentes acilantes com comprimentos de cadeia diferentes, não influencia o comportamento desta reacção. Contrariamente ao que era esperado, visto que, o ácido octanóico ao ser mais solúvel na fase aquosa deveria acumular-se na interface entre a fase aquosa e a fase orgânica e dessa forma, a sua conversão final deveria ser mais baixa do que a do ácido 11-bromoundecanóico.

Posteriormente a estes estudos, focámo-nos na RCE do 1-feniletanol (**15**) utilizando AASIs. O desenvolvimento e optimização desta metodologia são dos principais objectivos desta dissertação.

3.5 Estudo de novos agentes surfactantes que funcionam também como agentes acilantes, AASIs, em reacções de esterificação e transesterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.

3.5.1 Utilização de AASIs (1 e 2), em reacções de esterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.

Com o pressuposto de estudar a nova metodologia, realizámos a reacção de esterificação enzimática, representada no esquema 3.4, em que utilizámos como substrato modelo o 1-feniletanol (**15**) e como agente acilante, o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI **1**). Para realizar esta reacção, fizemos algumas alterações ao procedimento C da secção experimental, nomeadamente na quantidade de substratos (ácido e álcool) em que se utilizaram 0,414mmol de cada um, na quantidade de n-hexadecano em que se utilizou 20mg e na utilização de uma enzima diferente em que se utilizou 100µl de CALB L.



Esquema 3.4: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (**15**) com o AASI **1**, na presença de CALB L.

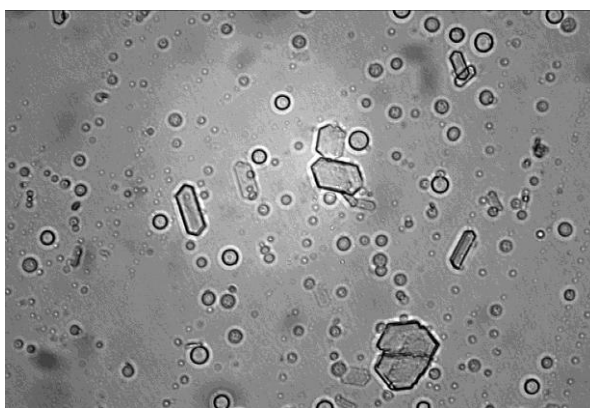


Figura 3.3: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x, de uma mistura reaccional contendo AASI **1**.

A RCE do 1-feniletanol (**15**), utilizando os AASIs **1** foi seguida pelo aumento do excesso enantiomérico (ee) do álcool de partida que não reagiu, neste caso o (S)-1-

feniletanol. Os valores dos ees obtidos ao longo do tempo estão representados no gráfico 3.5.

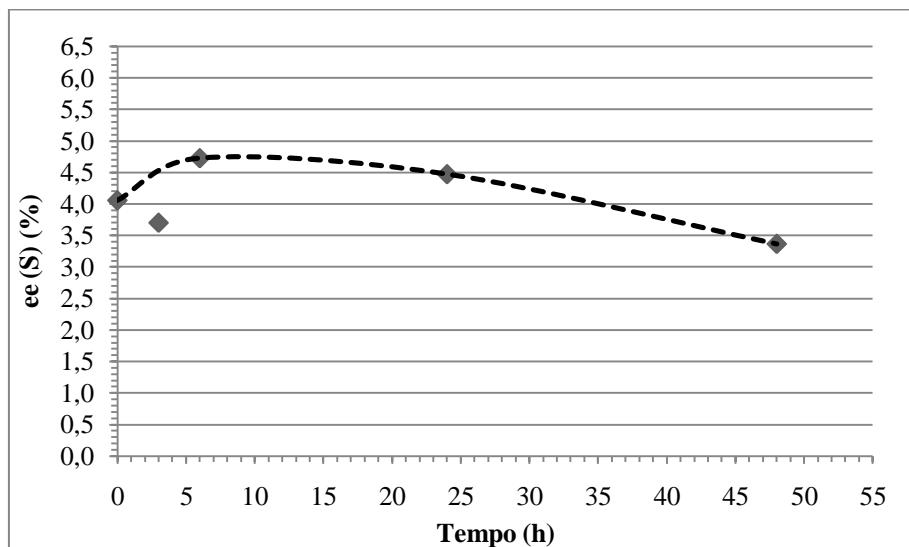
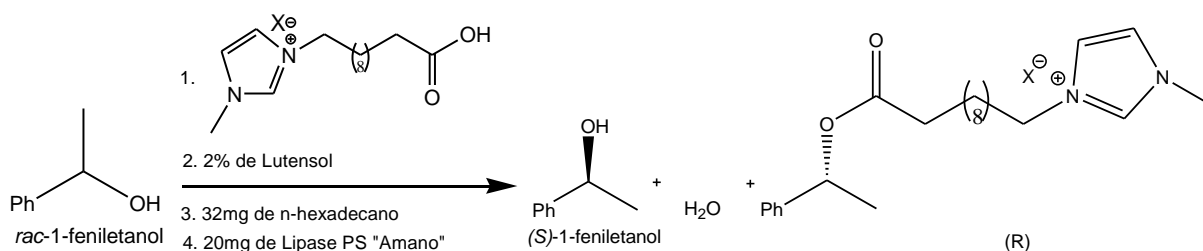


Gráfico 3.5: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando o AASI 1 na presença da CALB L, sem utilizar lutensol.

Podemos verificar através do gráfico 3.5 que não existem alterações significativas do ee ao longo do tempo e tal facto pode dever-se à baixa estabilidade das miniemulsões ao longo do tempo. Mais precisamente, verificámos macroscopicamente a presença de partículas sólidas na mistura reaccional, devido à baixa solubilização deste agente em água. Microscopicamente (ver figura 3.3) verificámos também que existe uma elevada quantidade de partículas sólidas e que a quantidade de miniemulsões formadas é baixa.

Assim, com o objectivo de tentar formar emulsões estáveis ao longo do tempo utilizando o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 1) e o tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 2) e dessa forma permitir a RCE do 1-feniletanol, utilizámos o lutensol como surfactante.

Para este estudo realizámos a reacção de esterificação enzimática, representada no esquema 3.5 e seguimos o procedimento C da secção experimental.



Esquema 3.5: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (**15**) com dois AASIs **1** e **2**, na presença de lipase PS "Amano".

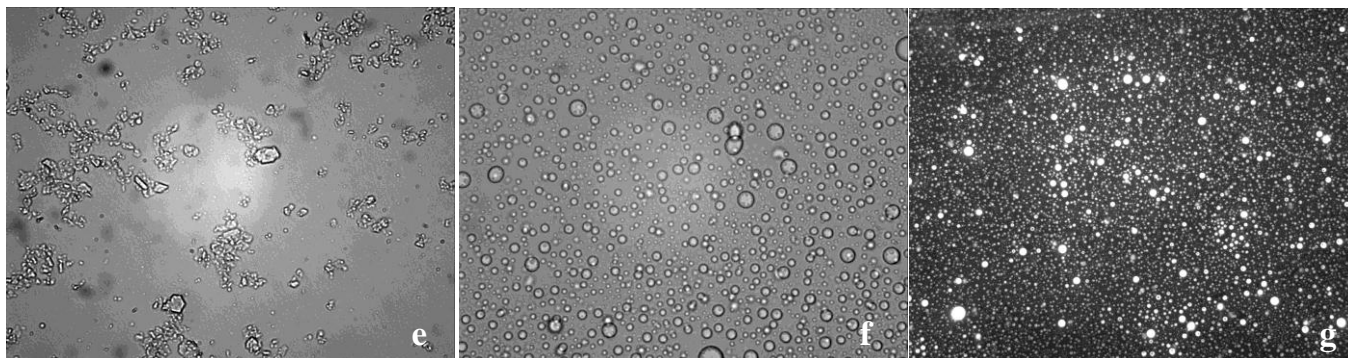


Figura 3.4: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x, de uma mistura reaccional contendo AASI **1** (e). Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (f) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação de 200x (g), de uma mistura reaccional contendo AASI **2**.

Através de uma análise macroscópica verificámos, tal como para a reacção sem lutensol, que o AASI **1** não permite a formação de emulsões estáveis. Microscopicamente (ver figura 3.4 (e)), verificámos que existem muito poucas emulsões formadas e também que existe uma elevada quantidade de partículas sólidas. Pelo contrário, a utilização do AASI **2** permite a formação de uma grande quantidade de miniemulsões, como pudemos observar por microscopia e por microscopia por fluorescência (ver figura 3.4 (f) e (g)). Não se observam, macroscopicamente e microscopicamente, partículas sólidas em solução. Contrariamente ao esperado para o AASI **2**, podemos verificar a partir do gráfico 3.6, que não existem alterações significativas no ee do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, evidenciando a existência de desestabilização das miniemulsões ao longo do tempo.

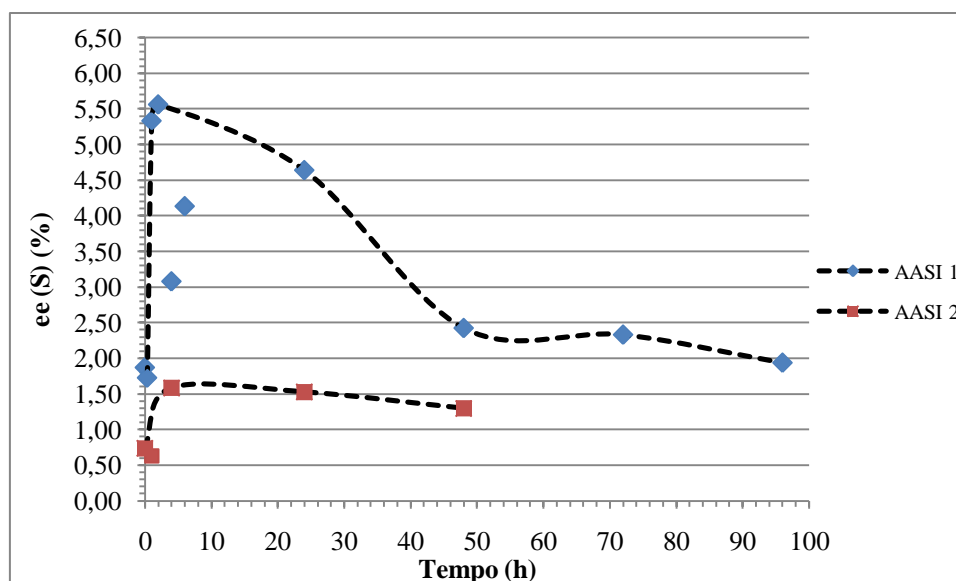


Gráfico 3.6: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando dois AASIs 1 e 2 em reacções de esterificação, na presença da Lipase PS “Amano”.

Os resultados negativos que obtivemos para estes AASIs podem estar relacionados com a baixa estabilização das miniemulsões ao longo do tempo, não permitindo a permanência do 1-feniletanol (**15**) no centro da gotícula sendo mais difícil a formação do produto da reacção (éster) e quando este se forma entrará em contacto com a água e sofrerá uma reacção de hidrólise, como também podem estar relacionados com uma desactivação enzimática, existindo um efeito desestabilizador do centro activo da enzima por parte do agente acilante.

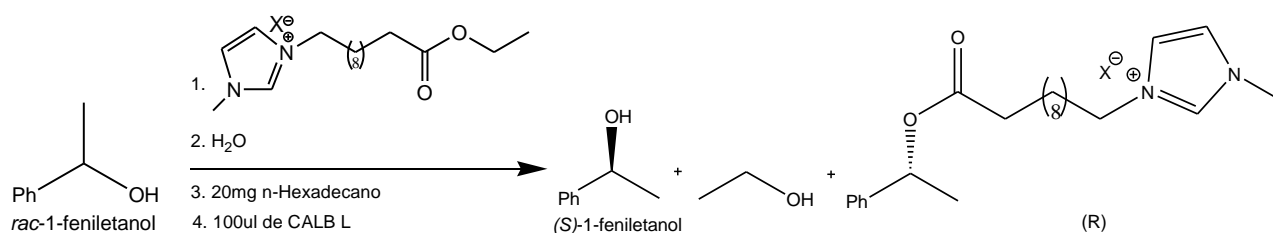
A baixa estabilização das miniemulsões pode estar relacionada com o carácter diiónico destes agentes acilantes em que o grupo carboxílico poderá funcionar também como surfactante e interferir com o anel imidazol destes agentes.

Podemos também verificar, comparando o gráfico 3.5 e o gráfico 3.6 que o lutensol não permite a formação de miniemulsões estáveis quando se utilizam estes AASIs.

3.5.2 Utilização de AASIs (4, 5, 6, e 7), em reacções de transesterificação enzimática em sistemas de miniemulsões.

Com a utilização de agentes acilantes na forma de ésteres (AASIs 4, 5, 6 e 7) pretendemos eliminar o carácter diiónico dos AASIs 1 e 2. A utilização de ésteres como agentes acilantes em reacções de transesterificação em sistemas de miniemulsões, também permite uma maior estabilização destas miniemulsões porque são compostos mais hidrofóbicos, permanecendo o grupo éster mais no centro da gotícula. Dessa forma, procedemos então à reacção de transesterificação enzimática, representada no esquema 3.6, utilizando como substrato modelo o 1-feniletanol (**15**) e como agentes acilantes os AASIs (4, 5, 6 e 7).

O procedimento utilizado para esta reacção apresenta algumas alterações ao procedimento C presente na secção experimental, nomeadamente, na quantidade de substratos (éster e álcool) em que se utilizou 0,414mmol de cada um, a quantidade de n-hexadecano em que se utilizou 20mg, na não utilização de lutensol e na utilização de um biocatalisador diferente, neste caso utilizou-se 100µL de CALB L.



Esquema 3.6: Reacção de transesterificação do 1-feniletanol (**15**) com quatro AASIs (4, 5, 6, e 7), cujos contra-íons são o Br, o PF₆, o BF₄ e o AOT, na presença de CALB L.

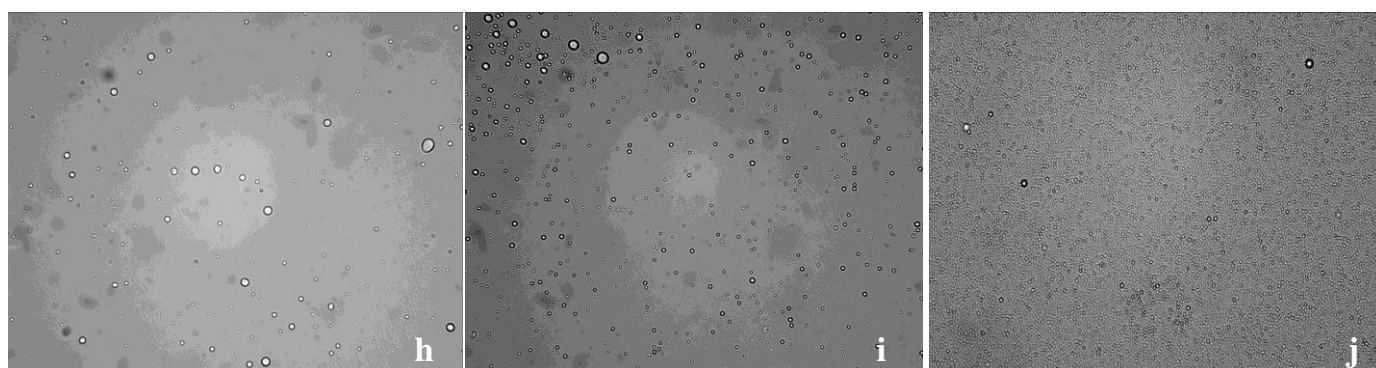


Figura 3.5: Imagens obtidas por microscopia com uma ampliação de 200x, de uma mistura reaccional contendo AASI 4 (h), AASI 6 (i) e AASI 7 (j).

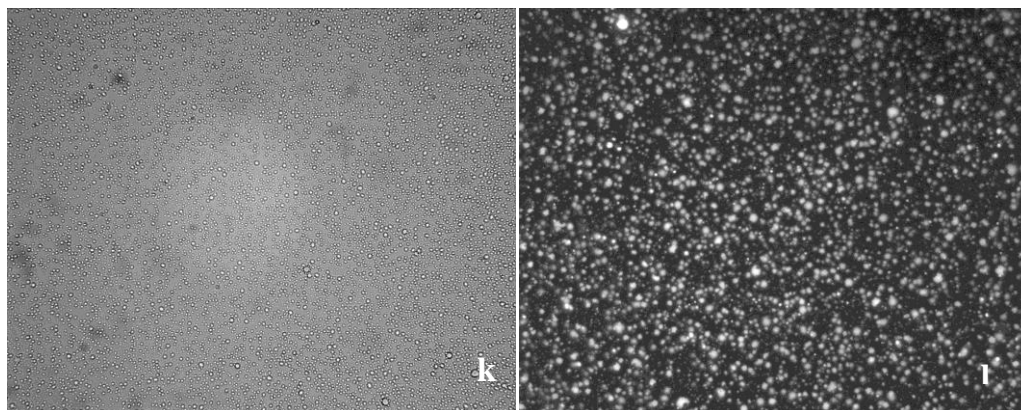


Figura 3.6: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x (k) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 200x (l), de uma mistura reaccional contendo AASI 5.

A RCE do 1-feniletanol (**15**) foi seguida pelo aumento do ee do álcool de partida que não reagiu, neste caso o (S)-1-feniletanol. Os valores dos ees obtidos ao longo do tempo estão representados no gráfico 3.7. A alteração do ee do (S)-1-feniletanol permitiu-nos verificar a ocorrência de uma reacção enantioselectiva.

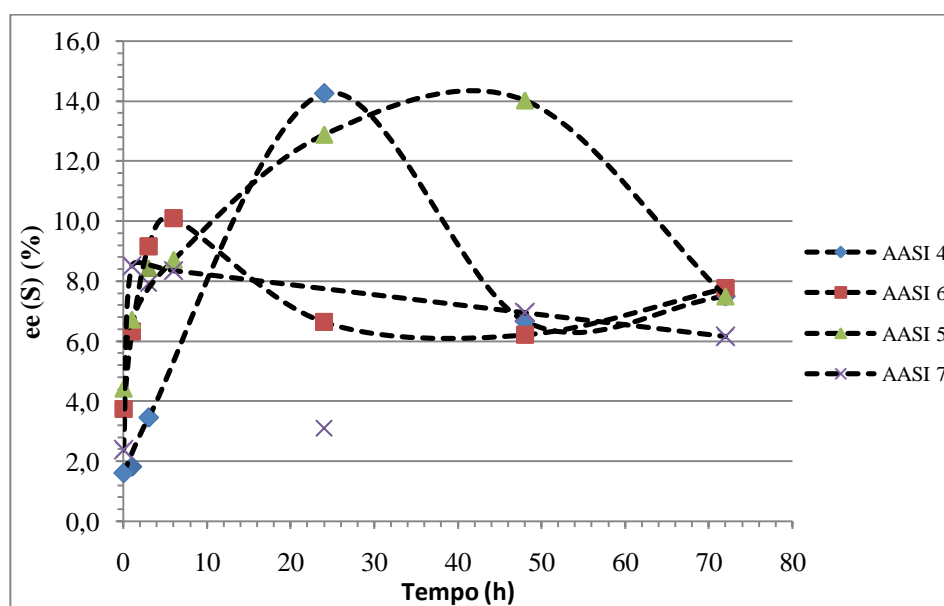


Gráfico 3.7: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando quatro agentes AASIs 4, 5, 6 e 7, na presença de CALB L.

Através da análise do gráfico 3.7 podemos verificar que, o brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 4) e o hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 5) são os dois AASIs que apresentam uma maior alteração do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, atingindo um valor de aproximadamente 14% após 24h e 48h de reacção.

Este valor é mais elevado quando comparado com os obtidos para os AASIs **1** e **2** mas ainda é relativamente baixo.

Por análise microscópica, o que verificámos foi que o AASI **5** (ver figura 3.6 (k)) e o dioctil sulfossuccinato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI **7**) (ver figura 3.5 (j)) são os dois ésteres que permitem a formação de uma maior quantidade de miniemulsões, sendo possível verificar por microscopia por fluorescência que o AASI **5** (ver figura 3.6 (l)) permite a formação de grandes aglomerados de miniemulsões.

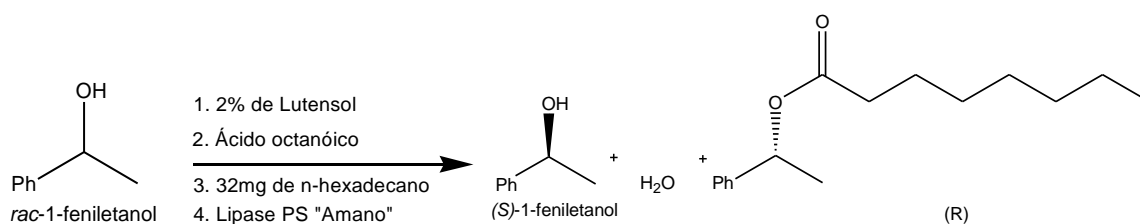
Como os AASIs são surfactantes não utilizámos nestas reacções de transesterificação o lutensol e podemos verificar, tanto a nível macroscópico como a nível microscópico, a formação de miniemulsões. Estes resultados são bastante importantes e demonstram que estes AASIs podem ter uma aplicação inovadora em sistemas de miniemulsões, visto que para além de permitirem a formação das miniemulsões também permitem a RCE do 1-feniletanol (**15**). Contudo esta RCE não é muito eficiente, visto que, os excessos enantioméricos obtidos foram relativamente baixos, aproximadamente 14%. As explicações para este facto são: baixa estabilidade das miniemulsões ao longo do tempo, interferência do agente acilante na actividade da enzima, ou diminuição da actividade da enzima devido à presença de etanol que é um dos produtos da reacção de transesterificação.

Assim, com o objectivo de garantir resultados mais satisfatórios da RCE de álcoois secundários em sistemas de miniemulsões, e tendo em conta que anteriormente verificámos por HPLC que existia um aumento da conversão do 1-feniletanol (**15**) ao longo do tempo, voltámos a focar o nosso estudo na reacção de esterificação do ácido octanóico com este álcool aromático mas também com outro álcool secundário alifático, o sulcatol (**16**), que é uma feromona que apresenta elevada importância comercial. Para além do estudo da RCE destes dois álcoois, também estudámos a separação do (S)-1-feniletanol, sendo este outro dos principais objectivos desta dissertação.

3.6 Estudo da resolução cinética enzimática do 1-feniletanol em sistemas de miniemulsões e posterior separação do (S)-1-feniletanol.

3.6.1 Resolução cinética enzimática do 1-feniletanol em sistemas de miniemulsões.

Para um estudo mais aprofundado da RCE do 1-feniletanol (**15**) em sistemas de miniemulsões, reproduzimos a reacção de esterificação enzimática, representada no esquema 3.7, em que se utilizaram como substrato modelo o 1-feniletanol (**15**) e como agente acilante o ácido octanóico, e onde se seguiu o procedimento C presente na secção experimental.



Esquema 3.7: Reacção de esterificação do 1-feniletanol (**15**) com o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS "Amano" (20mg; 40mg; 60mg).

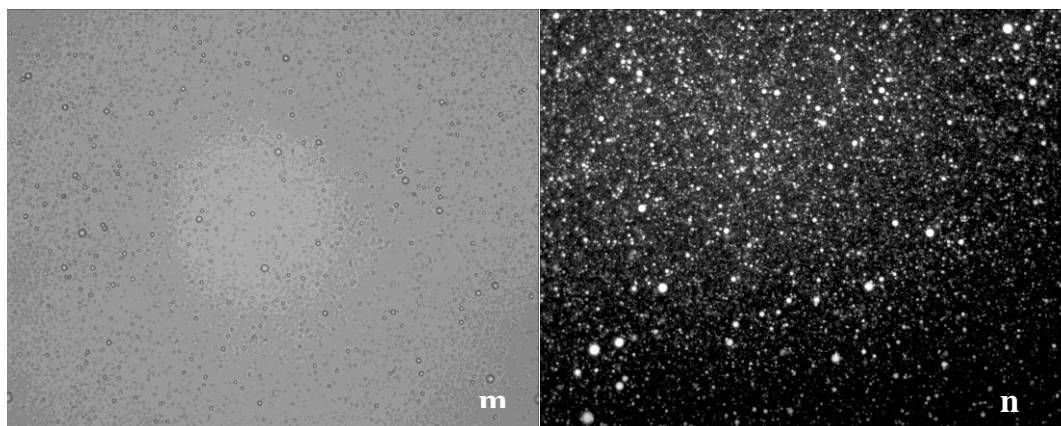


Figura 3.7: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x (m) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 200x (n), de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico e 1-feniletanol como substratos.

Verificámos por análise macroscópica, após 8 ciclos de ultrasons, que a mistura reaccional apresentava duas fases, uma mais densa de cor leitosa e uma menos densa mais incolor. Relativamente à estabilidade das miniemulsões podemos verificar por análise microscópica (ver figuras 3.7 (m) e (n)) que a utilização dos substratos, ácido octanóico e 1-feniletanol (**15**), para além do surfactante permitem a formação de miniemulsões estáveis.

Como sabemos, as miniemulsões apresentam uma área interfacial bem definida e bastante larga, onde se localiza a enzima., existindo uma determinada quantidade de

enzima que cobre toda a interface das miniemulsões. Então, até se atingir essa concentração de saturação deve-se observar um aumento no excesso enantiomérico do álcool que não reagiu, (S)-1-feniletanol. Assim, analisando o gráfico 3.8, onde estão representados os valores dos ees obtidos ao longo do tempo para diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg), podemos verificar que as três curvas apresentam o mesmo comportamento, apresentando as três aproximadamente 40% de excesso enantiomérico após 72h de reacção. A partir das 72h atingiu-se um patamar. Então o que podemos dizer é que estamos a trabalhar numa concentração de saturação de enzima, uma vez que, utilizando 20mg de enzima em 4mL de volume (5mg/mL) ou utilizando 60mg em 4mL de volume (15mg/mL) atingiu-se aproximadamente o mesmo valor de excesso enantiomérico para o mesmo tempo de reacção.

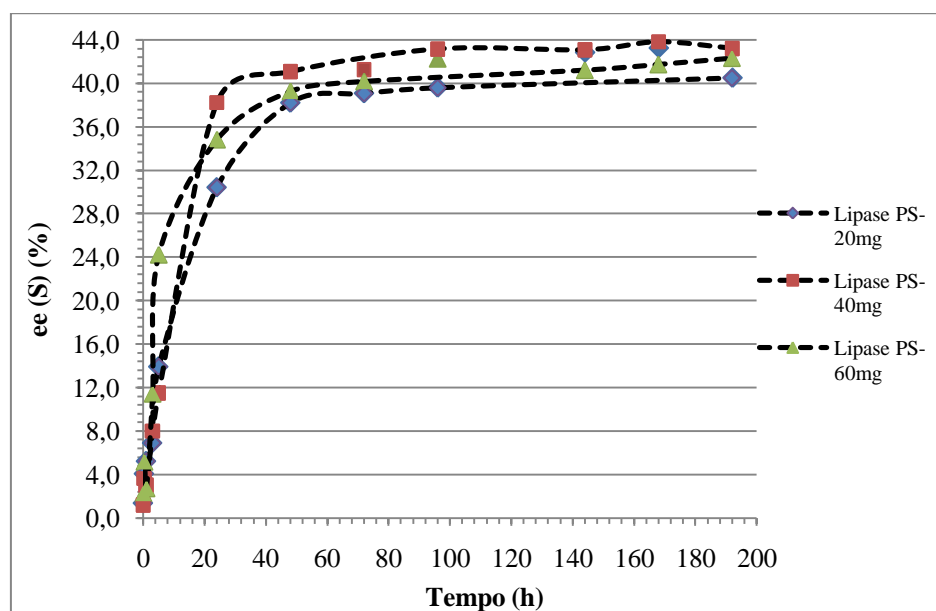


Gráfico 3.8: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol ao longo do tempo, utilizando como agente acilante o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano”.

Comparando estes resultados obtidos com os resultados obtidos para os agentes acilantes que obtiveram melhores resultados, neste caso os AASIs 4, 5, 6 e 7, podemos verificar que a utilização de um ácido com uma estrutura mais linear (ácido octanóico) permite a obtenção de valores de ee superiores. Tal facto pode dever-se, a uma maior estabilização das miniemulsões utilizando o ácido octanóico, visto que este permanece no centro da gotícula, ou ao facto deste ácido não interferir com a enzima como pode acontecer com os AASIs.

3.6.2 Separação do (S)-1-feniletanol após a resolução cinética enzimática deste composto.

Outro dos objectivos desta dissertação para além da RCE de álcoois secundários em miniemulsões inclui também a sua separação. Inicialmente planeámos fazer uma filtração por membranas de nano-filtração para separar os enantiómeros mas optámos primeiro por utilizar uma técnica mais simples, a desestabilização das miniemulsões a baixas temperaturas.

Realizámos a mesma reacção de esterificação enzimática descrita no esquema 3.5 mas deixámos a reacção decorrer durante 168h. Após este período de tempo tentámos separar o 1-feniletanol (**15**) através da desestabilização das miniemulsões à temperatura de 4°C. A esta temperatura observámos uma separação nítida de fases, correspondendo a fase menos densa, que é incolor à fase orgânica e a fase mais densa, que é turva à fase aquosa. A fase orgânica é composta pelo éster e também por uma grande percentagem de 1-feniletanol. Para existir uma completa separação, seria necessário que o 1-feniletanol (**15**), virtualmente, estivesse na sua totalidade na fase orgânica e para verificarmos se houve uma separação eficiente deste álcool, retirámos uma amostra de 100µL da fase aquosa, tratámo-la e posteriormente injectámos no GC. Verificámos assim que existia 1-feniletanol (**15**) nesta fase, e uma vez que, esta separação não foi eficaz e sabendo que 2% (% p/v) do 1-feniletanol (**15**) é solúvel em água, desenvolvemos uma estratégia com o intuito de retirar todo o álcool da solução.

Esta estratégia baseia-se na adição de sal, neste caso o cloreto de sódio (NaCl), que diminui a solubilidade do 1-feniletanol (**15**) em água. Este fenómeno é designado por salting-out, e o que acontece é que os iões em solução atraem as moléculas de solvente e são consequentemente rodeados por estas. Assim, quando um electrólito é adicionado a uma solução de um não electrólito, eles competem entre si por moléculas de solvente, acabando o electrólito por ganhar esta competição.^[66]

Fizemos então um estudo de diferentes concentrações de NaCl, 10%, 20% e 30% seguindo o procedimento D presente na secção experimental, e através da equação obtida a partir curva de calibração, representada no gráfico 6.1 em anexo, foi possível calcular a quantidade de 1-feniletanol (**15**) presente no meio aquoso. Verificámos por HPLC uma diminuição de 1,87% para 0,24% de 1-feniletanol (**15**) quando se adicionou 30% de NaCl, ver tabela 3.2. Colocando a solução no gelo durante aproximadamente

24h, obtivemos 0,03% de 1-feniletanol (**15**) para a maior concentração de NaCl, ver tabela 3.3. Estes resultados são bastante positivos porque de uma forma simples e económica conseguimos retirar praticamente todo o 1-feniletanol (**15**) presente na água.

Tabela 3.2: Estudo do efeito de diferentes concentrações de NaCl, 10%, 20% e 30%, na remoção dos 2% de 1-feniletanol que se encontram solúveis em água.

NaCl (% p/v)	Área	1-feniletanol (% p/v)
0	196096131	1,87
10	114676052	1,09
20	54430217	0,518
30	25408945	0,242

Tabela 3.3: Estudo do efeito de diferentes concentrações de NaCl, 10%, 20% e 30%, a uma temperatura de 4°C, na remoção dos 2% de 1-feniletanol que se encontram solúveis em água.

NaCl (% p/v)	Área	1-feniletanol (% p/v)
0	98241143	0,936
10	57704283	0,550
20	28476700	0,271
30	3196579	0,0304

Assim, optámos por utilizar esta mesma estratégia depois de termos procedido à RCE do 1-feniletanol (**15**) com o ácido octanóico seguindo o procedimento E da secção experimental, adicionando 30% de NaCl e deixando a mistura reaccional a uma temperatura de 4°C. Verificámos através de análise por HPLC que com a adição de NaCl houve uma redução na quantidade de 1-feniletanol (**15**) presente na fase aquosa de 0,93% para 0,07% (ver tabela 3.4), sendo mais uma vez um resultado bastante positivo.

Tabela 3.4: Estudo do efeito da adição de 30% de NaCl numa mistura reaccional com 1-feniletanol.

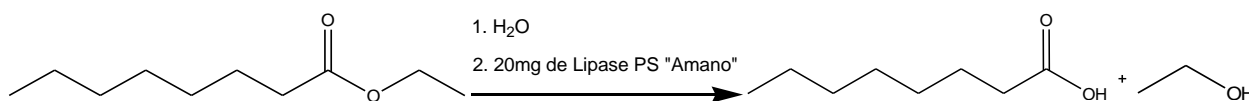
NaCl (% p/v)	Área	1-feniletanol (% p/v)
0	97143970	0,93
30	7277610	0,069

Depois de estudarmos a separação do 1-feniletanol (**15**) da água, tentámos desenvolver um processo de separação de ambos os enantiómeros sem recorrer a solventes orgânicos com o intuito de mais uma vez se utilizar um processo mais verde e, dessa forma pensámos recorrer a processos de filtração através de membranas tendo em conta os diferentes pesos moleculares do álcool enantiomérico e do éster correspondente. Assim, o que teoricamente iria acontecer era a passagem do álcool

através da membrana e a retenção do éster. Fizemos apenas uns estudos preliminares utilizando uma membrana NF030 da Nadir, MWCO de 300Da a uma pressão de aproximadamente 20bar, já no final do trabalho prático desenvolvido, utilizando o 1-feniletanol (**15**) e o laurato de 1-feniletilo dissolvidos num solvente orgânico (hexano) e determinámos por HPLC o conteúdo do retentado e o conteúdo do permeado. Verificámos então que, tanto no retentado como no permeado existia o 1-feniletanol (**15**) e o laurato de 1-feniletilo. Podemos dizer então que, esta separação não é eficiente sendo necessário otimizar o processo ou encontrar alternativas.

3.7 Estudo da reacção de hidrólise do éster (etiloctanoato) ao longo do tempo.

Com o intuito de estudarmos, no futuro a separação do álcool enantiómerico que reagiu, o (R)-1-feniletanol, procedemos a uma reacção de hidrólise de um éster, o etiloctanoato, que está representada no esquema 3.8. Para a realização desta reacção utilizámos 800mg (4,64mmol) de etiloctanoato em 4mL de água.



Esquema 3.8: Reacção de hidrólise do etiloctanoato na presença de Lipase PS “Amano”.

O perfil da reacção de hidrólise do éster foi estudado através dos valores da razão área etiloctanoato/área ácido octanóico obtidos ao longo do tempo, e está representado no gráfico 3.9. As áreas do etiloctanoato e do ácido octanóico foram determinadas por GC.

Analisando o gráfico 3.9 verificamos que o perfil da reacção de hidrólise inicialmente demonstra um rápido decréscimo do conteúdo em éster, passando de uma razão área etiloctanoato/área ácido octanóico de 247 para aproximadamente 12, após 20min de reacção. Após 192h de reacção verificamos que o decréscimo já não é tão acentuado, uma vez que grande parte do etiloctanoato foi hidrolisado em ácido octanóico, passando de uma razão de 12 para 2. Destes resultados, podemos inferir que a Lipase PS “Amano” catalisa com elevada eficiência a reacção de hidrólise do éster em água, demonstrando que esta estratégia pode ser adoptada com elevada eficiência na formação do (R)-1-feniletanol.

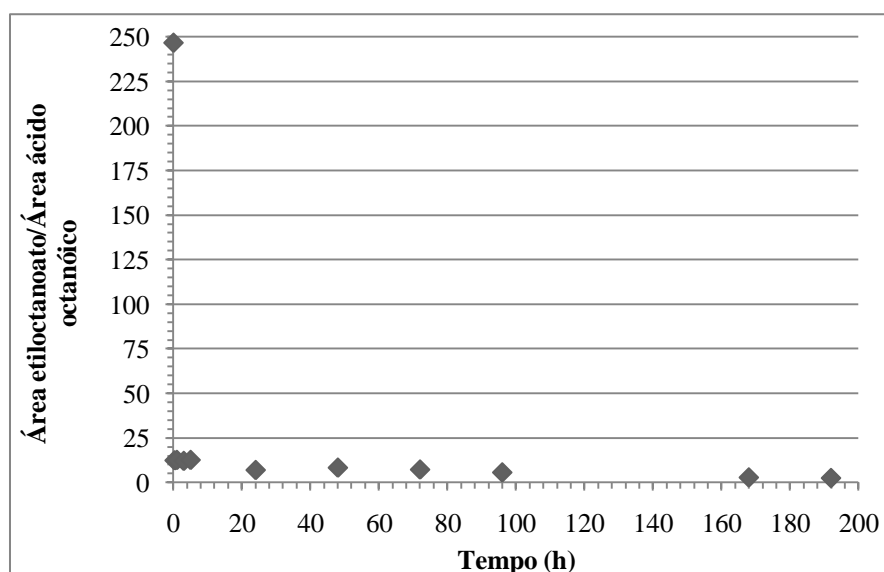
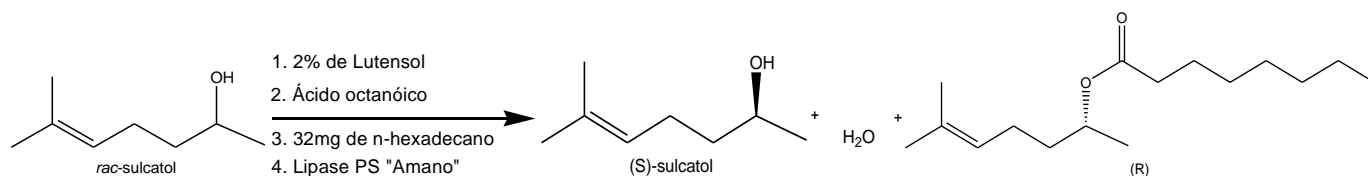


Gráfico 3.9: Representação gráfica da razão de áreas de etilcanoato (substrato) sobre áreas de ácido octanoico (produto), obtidas a partir de uma reacção de hidrólise na presença de Lipase PS “Amano”.

3.8 Estudo da resolução cinética enzimática do sulcatol em sistemas de miniemulsões.

No sentido de estudar a RCE em compostos com elevado potencial económico, decidimos utilizar o sulcatol (6-metil-5-hepten-2-ol) como substrato modelo de uma reacção de esterificação enzimática. O sulcatol é uma feromona de agregação produzida pelo macho dos besouros ambrósia (*Gnathotrichus sulcatus*), que atacam as madeiras.^[67] Estes insectos são economicamente importantes no oeste da América do Norte. Existem vários estudos de laboratório e de campo que têm revelado que diferentes espécies respondem aos compostos com diferentes excessos enantioméricos.^[68] *Gnathotrichus sulcatus* produz uma mistura 65%/35% de (S)-(+)-sulcatol e (R)-(-)-sulcatol. Estes dois enantiómeros actuam sinergeticamente para desencadear uma resposta de agregação por parte do besouro.^[69] Pelo contrário, *Gnathotrichus retusus* produz o (S)-enantiómero, e a sua resposta é inibida pelo (R)-enantiómero. Tem havido bastante interesse na síntese do sulcatol na sua forma enantiomericamente pura, inicialmente para os diversos estudos biológicos, e mais tarde como um potencial agente para o enclausuramento dos insectos em vários programas de controlo de pragas. O sulcatol também tem servido como intermediário de outros produtos naturais.^[68]

Para a realização da reacção de esterificação enzimática, representada no esquema 3.9, utilizou-se como substrato modelo o sulcatol (**16**) e como agente acilante o ácido octanóico, e seguiu-se o procedimento C presente na secção experimental.



Esquema 3.9: Reacção de esterificação do sulcatol (**16**) com o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS "Amano" (20mg; 40mg; 60mg).

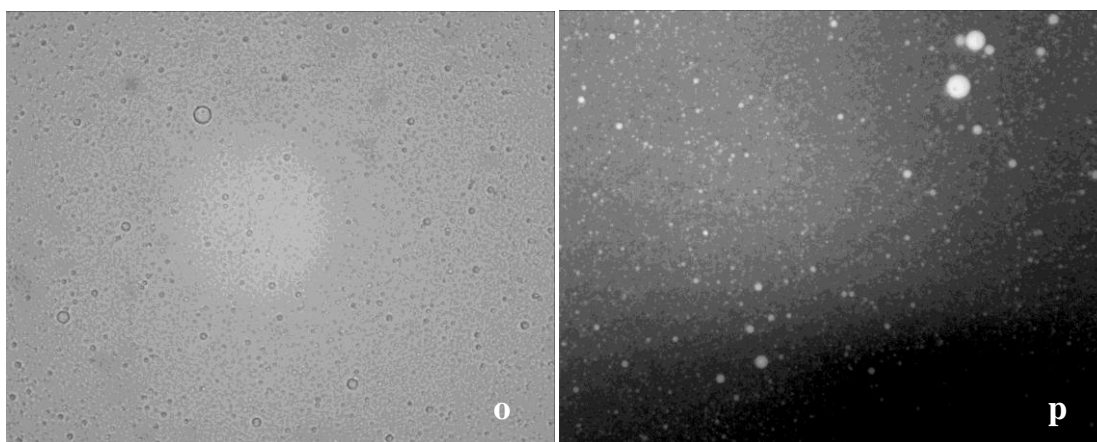


Figura 3.8: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (o) e imagem obtida por microscopia por fluorescência com uma ampliação 500x (p), de uma mistura reaccional contendo ácido octanóico e sulcatol como substratos.

Inicialmente, verificámos por análise macroscópica, após 8 ciclos de ultrasons, que a mistura reaccional apresenta apenas uma fase de cor leitosa. Relativamente à estabilidade das miniemulsões verificámos por análise microscópica (ver figuras 3.8 (o) e (p)) que a utilização dos substratos, ácido octanóico e sulcatol (**16**), para além do surfactante permitem a formação de miniemulsões estáveis.

Analizando o gráfico 3.10, onde estão representados os valores dos ees obtidos ao longo do tempo para diferentes quantidades de Lipase PS "Amano" (20mg; 40mg; 60mg), é claramente visível que há um aumento do excesso enantiomérico depois da adição de uma elevada quantidade de enzima que catalisa a reacção de esterificação. Mais precisamente, utilizando 20mg de enzima em 4mL de volume (5mg/mL) atingiu-se um valor máximo de excesso enantiomérico de aproximadamente 34% após 192h de reacção. Para o mesmo período de tempo, mas adicionando 60mg de enzima em 4mL de volume (15mg/mL) atingiu-se um valor máximo de excesso enantiomérico de

aproximadamente 77%. Verificámos também que, nas três curvas não existe a formação de um patamar, de onde podemos induzir que para esta reacção não estamos a trabalhar numa concentração de saturação de enzima. Dessa forma, poderá ser possível obter ainda resultados mais elevados de ee utilizando uma concentração de enzima acima dos 15mg/mL.

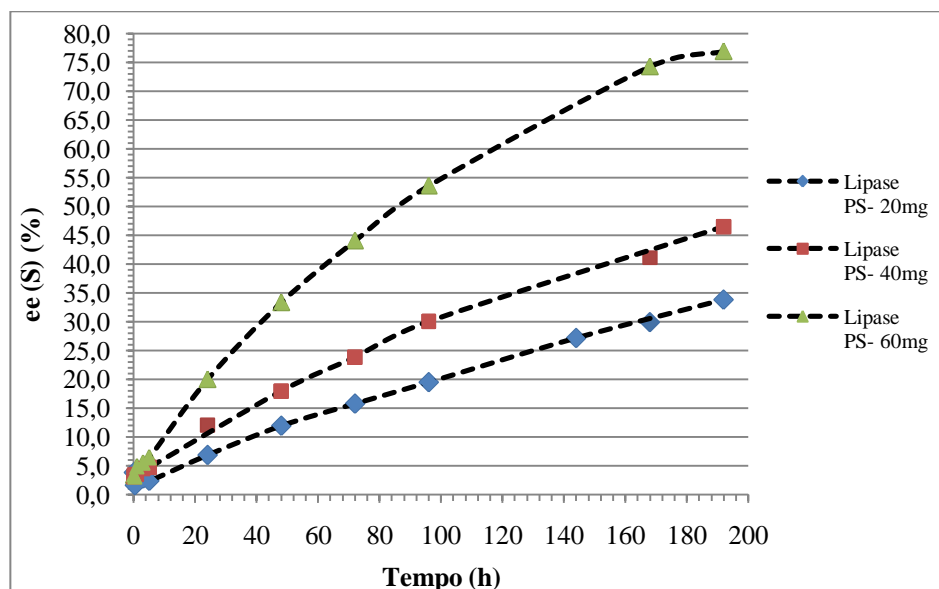


Gráfico 3.10: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-sulcatol ao longo do tempo, utilizando como agente acilante o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano”.

Comparando estes resultados obtidos com os obtidos para o 1-feniletanol (**15**), verificamos que, utilizando como substrato modelo o sulcatol (**16**), o valor de excesso enantiomérico obtido para a concentração elevada de enzima é bastante superior ($\approx 77\%$) ao valor obtido para o 1-feniletanol (**15**) ($\approx 40\%$). Esta diferença tão acentuada entre os dois álcoois secundários, possivelmente deve-se a uma maior estabilidade das miniemulsões utilizando o sulcatol (**16**). Macroscopicamente observámos uma cor leitosa da mistura reaccional com o sulcatol (**16**) ao longo das 192h, já o mesmo não aconteceu com o 1-feniletanol (**15**) em que quando adicionamos a Lipase PS “Amano” a mistura reaccional começou a ficar turva para além de começar a existir formação de duas fases.

Realizámos também a mesma reacção representada no esquema 3.9, mas deixámos a reacção decorrer durante 192h sem retirar nenhuma amostra. Após estas 192h, fizemos uma extracção orgânica com éter dietílico e posteriormente evaporámos a

amostra. Esta amostra foi analisada por ^1H RMN, para calcular a conversão final do sulcatol (**16**), visto que, não foi possível determinar a conversão deste ao longo do tempo por GC. Com este procedimento pretende-se evitar os erros associados à recolha de alíquotas de uma amostra heterogénea.

Conseguimos calcular assim, a conversão final e o excesso enantiomérico do produto (eep). O excesso enantiomérico do produto (eep) foi determinado a partir da equação 1.7. Os valores do ees, do eep e da conversão estão representados na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Resultados obtidos da RCE de sulcatol com o ácido octanóico, na presença de Lipase PS “Amano”, após 192h. ^aDeterminado por GC. ^bDeterminado pela equação 1.7. ^cDeterminado por ^1H RMN.

Tempo (h)	ees ^a (S) (%)	eep ^b (R) (%)	Conversão ^c (%)
192	48,5	90,1	35,0

Obtivemos assim, para uma mistura reaccional que reagiu durante 192h, uma conversão de 35%, um ees de aproximadamente 49% e um eep de aproximadamente 90% (valores apresentados na tabela 3.5). De acordo com o esperado, estes resultados indicam que a reacção é enantioselectiva para o enantiómero (R), apresentando um valor de razão enantiomérica (E) de 30 (ver figura 6.9 em anexo). Estes resultados são bastante promissores evidenciando uma RCE do sulcatol (**16**) bastante eficiente, tornando possível a aplicação deste processo a outros compostos.

Estudámos também a influência da quantidade de substrato na resolução enantiomérica do sulcatol (**16**), nomeadamente o efeito da adição de maior quantidade de ácido octanóico. Para tal realizámos uma reacção idêntica à representada no esquema 3.9, mas em vez de utilizarmos um equivalente (eq) de ácido octanóico utilizámos 3 equivalentes (eq).

Os valores de ee do (S)-sulcatol obtidos ao longo do tempo, em reacções de esterificação de ácido octanóico, utilizando 1eq e 3eq, com (S)-sulcatol, na presença de 20mg de Lipase PS “Amano”, estão representados no gráfico 3.11.

Analisando o gráfico 3.11, verificamos que os perfis das reacções são bastante semelhantes, sendo os valores de excesso enantiomérico, da curva pertencente a 1 eq de ácido octanóico, sempre superiores aos valores de excesso enantiomérico, da curva pertencente a 3eq de ácido octanóico. Verificámos que, o excesso enantiomérico decresce com o aumento da quantidade de ácido octanóico quando comparado com a

aplicação equimolar dos substratos, o que sugere que um excesso de ácido pode apresentar um efeito inibidor na Lipase PS “Amano”. Daqui podemos deduzir que, a adição de maior quantidade de ácido não desloca o equilíbrio no sentido da formação de produto, visto que estamos a utilizar ácido octanóico em excesso.

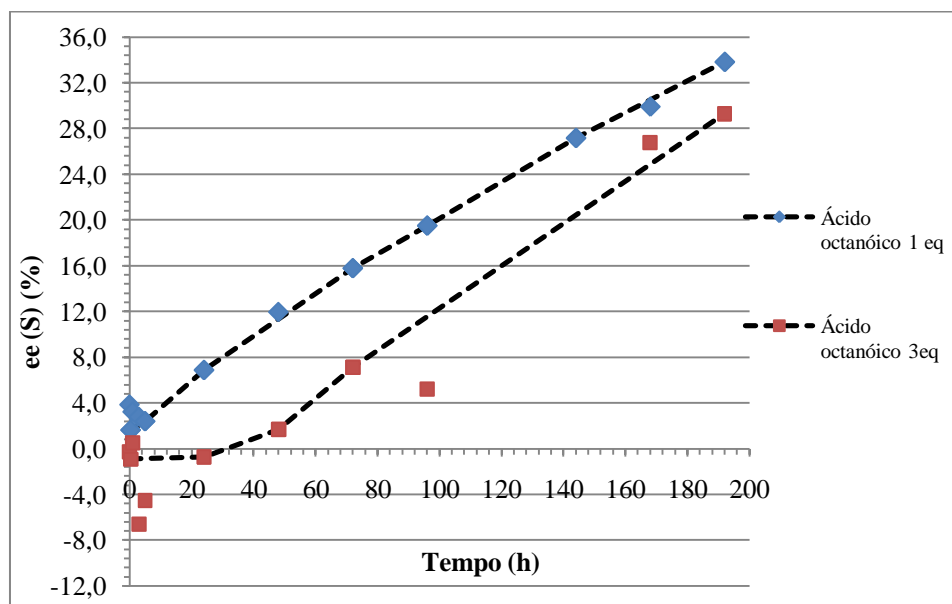


Gráfico 3.11: Representação gráfica do excesso enantiomérico do (S)-sulcatol ao longo do tempo, utilizando duas concentrações diferentes de ácido octanóico (1eq e 3eq), na presença de Lipase PS “Amano”.

CAPÍTULO 4- CONCLUSÃO

Como conclusão, a utilização de diferentes AASIs não permitiu uma eficiente RCE de uma mistura racémica de 1-feniletanol (**15**) em sistemas de miniemulsões. Mais precisamente, verificámos que os AASIs, principalmente o brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (**1**) e o tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (**2**), não permitiram a formação de miniemulsões estáveis ao longo do tempo e dessa forma a RCE ficou comprometida, evidenciando baixos valores de excesso enantiomérico ao longo do tempo.

No que diz respeito aos AASIs **4**, **5**, **6** e **7**, estes apresentam valores de excesso enantioméricos mais elevados do que os obtidos para os AASIs **1** e **2**, com o brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI **4**) e o hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI **5**) a obterem um melhor desempenho, apresentando um excesso enantiomérico máximo de aproximadamente 14%. Contudo, os resultados obtidos não foram satisfatórios, evidenciando que a metodologia utilizada não é muito eficiente em reacções de esterificação e transesterificação que ocorrem em sistemas de miniemulsões.

Dessa forma, focámo-nos mais na RCE de dois álcoois enantioméricos (1-feniletanol (**15**) e sulcatol (**16**)) utilizando um ácido mais apolar, o ácido octanóico. Obtivemos para o 1-feniletanol (**15**) valores de excesso enantiomérico mais elevados utilizando o ácido octanóico do que utilizando os AASIs. Mas verificámos que, mesmo utilizando o ácido octanóico como agente acilante a conversão da reacção de esterificação foi baixa (21%). Podemos dizer então que, o 1-feniletanol (**15**) é um álcool secundário que interfere com a estabilidade das emulsões, existindo separação de fases depois da mistura reaccional ser sujeita a vários ciclos de ultrasons, e não permitindo assim uma boa conversão em produto ao longo do tempo.

Com o intuito de estudarmos álcoois secundários com maior interesse comercial, utilizámos o sulcatol (**16**) que é uma feromona e efectuámos o mesmo tipo de estudo que foi efectuado para o 1-feniletanol (**15**) utilizando o ácido octanóico como agente acilante. A RCE do sulcatol (**16**) foi a resolução em que se obtiveram os melhores resultados, de excesso enantiomérico de substrato, onde para a maior concentração de enzima se obteve aproximadamente 77% como valor máximo. Este valor é mais elevado do que o obtido para o 1-feniletanol (**15**), aproximadamente 40%. Obtivemos também

após 192h de reacção, valores bastante interessantes de excessos enantioméricos de substrato e de produto que foram de aproximadamente 49% e 90%, respectivamente, como também de conversão e de razão enantiomérica em que obtivemos para o sulcatol (16) 35% e 30, respectivamente. Podemos concluir assim que, a RCE utilizando o sulcatol (16) como álcool secundário em sistema de miniemulsões permite a obtenção de resultados bastante positivos, evidenciando que a utilização deste álcool secundário permite a formação de emulsões estáveis ao longo do tempo contrariamente ao 1-feniletanol (15).

A utilização de um sistema de miniemulsões na resolução enantiomérica de álcoois secundários é uma grande vantagem porque permite que a reacção de esterificação ocorra no sentido directo, não ocorrendo a reacção de hidrólise. Além disso, tem a vantagem do meio ser aquoso não sendo necessário recorrer a solventes orgânicos que como foi referido anteriormente na introdução, apresentam desvantagens tanto no contexto ambiental como no contexto enzimático (como por exemplo: estabilidade da enzima). Outra das vantagens da utilização de um sistema de miniemulsões é que as enzimas utilizadas (lipases) apresentam elevada actividade na interface formada entre duas fases, tal como acontece neste tipo de sistema, em que existe uma fase aquosa e uma fase orgânica.

No entanto, no futuro ainda é necessário otimizar a reacção neste tipo de sistema, com a necessidade de se obter conversões do enantiómero R muito próximas de 50%, e é necessário também estudar a melhor metodologia para se separar ambos os enantiómeros, com o intuito de se obter um processo viável, tanto a nível económico como a nível ambiental.

Relativamente à utilização de AASIs, apesar dos resultados obtidos não terem sido muito positivos, não podemos descurar as suas potencialidades em RCEs em sistemas de miniemulsões. Assim, é necessário um estudo mais aprofundado da utilização de diferentes álcoois secundários como substratos modelos neste tipo de metodologia, analisando tanto a estabilidade das miniemulsões como também a conversão do enantiómero desejado ao longo do tempo. Será também necessário fazer um estudo aprofundado da influência da concentração de enzima e da influência da temperatura nestas resoluções cinéticas enzimáticas.

CAPÍTULO 5- BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Chen, J. Fang, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4349.
- [2] H. Yun, Y. Yang, B. Cho, B. Hwang, B. Kim, *Biotechnology Letters* **2003**, 25, 809.
- [3] A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. S. Malik, S. Azeeda, *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 569.
- [4] J. M. Keith, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 5.
- [5] A. Parvulescu, J. Janssens, J. Vanderleyden, D. Vos, *Top Catal* **2010**, 53, 931.
- [6] R. Lovlin, M. Vakily, F. Jamali, *Journal of Chromatography B* **1996**, 679, 196.
- [7] N. M. T. Lourenço, C. A. M. Afonso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8178.
- [8] K. Benaissi, M. Poliakoff, N. R. Thomas, *Green Chem.* **2009**, 11, 617.
- [9] M. Adamczak, S. H. Krishna, *Biotechnol* **2004**, 42, 251.
- [10] N. Krieger, W. Steiner, D. Mitchell, *Biotechnol* **2004**, 42, 219.
- [11] A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications.*, 1 ed., Springer, **2008**, p. 399.
- [12] S. H. Krishna, *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 239.
- [13] L. Ragupathy, B. Pluhar, U. Ziener, H. Keller, R. Dyllick-Brenzinger, K. Landfester, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, 62, 270.
- [14] U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17 578.
- [15] A. Buthe, A. Kapitain, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2005**, 35, 93.
- [16] R. Dalla-Vecchia, M. G. Nascimento, V. Soldi, *Quim. Nova* **2004**, 27, 623.
- [17] K. Jaeger, M. T. Reetz, *TIBTECH* **1998**, 16, 396.
- [18] H. P. Xiao, Z. Y. Li, O. P. Ward, *Journal of Industrial Microbiology* **1995**, 14, 416.
- [19] H. Shin, J. Kim, T. Kim, S. Kim, Y. Lee, *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 30, 835.
- [20] P. L. A. Overbeeke, C. Govardha, N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, 10, 385.
- [21] H. Seo, S. Kim, K. Han, J. Park, Y. Kim, S. Sim, J. Lee, *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1794, 519.
- [22] I. Hoegh, S. Patkar, T. Halkier, M. T. Hansen, *Can. J. Bot.* **1995**, 73, 869.
- [23] M. Martinelle, K. Hult, *Biochimica et Biophysica Acta* **1995**, 1251, 191.
- [24] N. Zhang, W. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, *Protein Engineering* **2003**, 16, 599.
- [25] O. Kirk, M. W. Christensen, *Organic Process Research & Development* **2002**, 6, 446.
- [26] J. Uppenberg, N. Ohmer, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, I. V. Waagen, T. Anthomen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, 34, 16838.
- [27] Kwon, C. Hoon, D. Y. Shin, J. H. Lee, S. W. Kim, J. W. Kang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 17, 1098.
- [28] A. O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4582.
- [29] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656.
- [30] D. Rotticci, F. Haeffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1998**, 5, 267.

- [31] K. Dabkowska, K. W. Szewczyk, *Biochemical Engineering Journal* **2009**, 46, 147.
- [32] S. Raza, L. Fransson, K. Hult, *Protein Science* **2001**, 10, 329.
- [33] Z. Lü, Y. Chu, Y. Han, Y. Wang, J. Liu, *J Chem Technol Biotechnol* **2005**, 80, 1365.
- [34] K. Landfester, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2006**, 36, 231.
- [35] J. Doucet, Universität Ulm **2007**.
- [36] H. Gröger, O. May, H. Hüskén, S. Georgeon, K. Drauz, K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1645.
- [37] T. Sakai, K. Kamogawa, K. Nishiyama, H. Sakai, M. Abe, *Langmuir* **2002**, 18, 1985.
- [38] M. Celis, A. Gil, A. Forgiarini, L. H. Garcia-Rubio, *Journal of Dispersion Science and Technology* **2009**, 30, 1384.
- [39] K. Landfester, *J. Dispersion Science and Technology* **2002**, 23, 167.
- [40] Y. C. Chukwumah, L. T. Walker, M. Verghese, S. Ogutu, *Ultrasonics Sonochemistry* **2009**, 16, 293.
- [41] J. Skrlíková, V. Andruch, I. S. Balogh, H. Sklenářová, P. Solich, *Anal. Methods* **2010**, 2, 1275.
- [42] M. Sophocleous, *Hydrogeology Journal* **2010**, 18, 811.
- [43] J. Pellicer, J. A. Manzanares, S. Mafé, *Am. J. Phys.* **1995**, 63, 542.
- [44] R. Nagarajan, E. Ruckenstein, *Langmuir* **1991**, 7, 2934.
- [45] J. Łuczak, J. Hupka, J. Thöming, C. Jungnickel, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2008**, 329, 125.
- [46] Z. Wang, J. Xu, W. Zang, B. Zhuang, H. Qi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, 61, 118.
- [47] H. Nakayama, K. Shinoda, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1967**, 40, 1797.
- [48] K. Tsujll, J. Mino, *The Journal of Physical Chemistty* **1978**, 82, 1610.
- [49] T. L. Greaves, C. Drummond, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1709.
- [50] A. Pohar, I. Plazl, P. Znidarsic-Plazl, *Lab Chip* **2009**, 9, 3385.
- [51] Z. Qiu, J. Texter, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2008**, 13, 252.
- [52] D. F. Evans, A. Yamauchi, R. Roman, E. Z. Casassa, *Journal of Colloid and Interface Science* **1982**, 88, 89.
- [53] F. Yan, J. Texter, *Chem. Commun.* **2006**, 2696.
- [54] V. Pino, C. Yao, J. L. Anderson, *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 333, 548.
- [55] M. Anouti, J. Jones, A. Boisset, J. Jacquemim, M. Caillon-Caravanier, D. Lemordant, *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 340, 104.
- [56] M. H. Vermuë, J. Tramper, *Pure & Appl. Chem* **1995**, 67, 345.
- [57] A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, 3192.
- [58] K. Yang, Y. Wang, *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, 35, 223.
- [59] M. Moniruzzaman, N. Kamiya, K. Nakashima, M. Goto, *ChemPhysChem* **2008**, 689.
- [60] K. Manabe, X. Sun, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10101.
- [61] E. M. Aschenbrenner, C. K. Weiss, K. Landfester, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 2434.
- [62] L. Fan, W. Eli, S. Yang, *Journal of Dispersion Science and Technology* **2008**, 29, 880.
- [63] R. Dave, D. Madamwar, *Process Biochemistry* **2008**, 43, 70.

- [64] G. R. Castro, B. K. Larson, B. Panilaitis, D. L. Kaplan, *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 67, 767.
- [65] S. D. Fowler, P. Greenspan, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1985**, 33, 833.
- [66] P. K. Grover, R. L. Ryall, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 1.
- [67] G. Y. Ishmttratorov, R. Y. Kharisov, M. P. Yakovleva, R. R. Muslukhov, E. G. Galkin, V. S. Shmakov, T. V. Khakimova, G. A. Tolstikov, *Russian Chemical Bulletin* **2000**, 49, 717.
- [68] S. G. Davies, G. D. Smyth, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1005.
- [69] J. H. Bordon, J. R. Handley, J. A. Mclean, R. M. Silverstein, L. Chong, K. N. Slessor, B. D. Johnston, H. R. Schuler, *Journal of Chemical Ecology* **1980**, 6, 445.

CAPÍTULO 6- ANEXOS

6.1 Curva de calibração determinada por HPLC, utilizada para determinar a percentagem de 1-feniletanol presente em meio aquoso.

Para se obter uma curva de calibração necessária para determinar a percentagem de 1-feniletanol existente em meio aquoso depois de adicionar diferentes concentrações de NaCl, utilizou-se as seguintes soluções padrão, de acordo com a tabela 6.1:

Tabela 6.1: Valores dos volumes adicionados de uma solução de 20mg/ml de 1-feniletanol e dos volumes adicionados de água para preparar amostras com diferentes percentagens de 1-feniletanol.

Padrões	1-feniletanol (% p/v)	Volume adicionado de uma solução de 20mg/ml de 1-feniletanol (ml)	Volume adicionado de água (ml)
1	0,20	0,10	0,90
2	0,50	0,25	0,75
3	1,0	0,50	0,50
4	1,5	0,75	0,25
5	2,0	1,0	0,00

A solução de 20mg/ml de 1-feniletanol foi preparada num balão volumétrico de 10ml. Pesou-se 200mg de 1-feniletanol, depois de o balão ter sido tarado, perfazendo-se depois o volume do balão com água. Esta solução de 20mg/ml de 1-feniletanol corresponde a 2% de 1-feniletanol. Todas as amostras padrão foram preparadas a partir da solução de 20mg/ml como se pode ver na tabela 6.1.

Na tabela 6.2 estão representados os valores das percentagens padrão de 1-feniletanol e das áreas dos picos cromatográficos correspondentes obtidas por HPLC.

Tabela 6.2: Valores das percentagens de 1-feniletanol das amostras padrão e áreas dos picos correspondentes obtidas por HPLC.

Padrão	1-feniletanol (% p/v)	Área
1	0,20	12120558
2	0,50	57299274
3	1,0	107842157
4	1,5	158071154
5	2,0	207507550

No gráfico 6.1 está representada a curva de calibração obtida para o 1-feniletanol. A equação representada no gráfico 6.1 foi obtida obrigando a recta a passar pela origem.

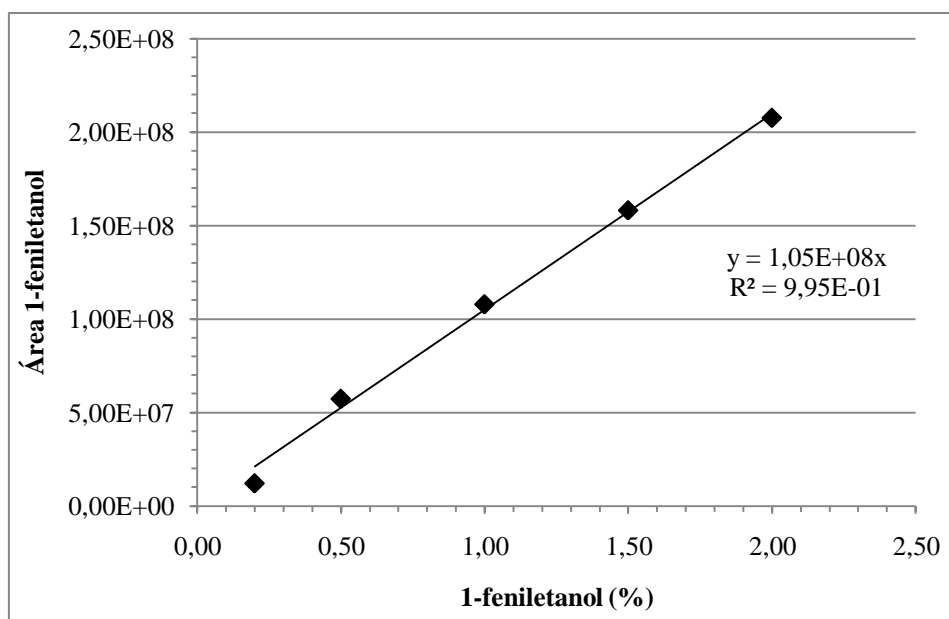


Gráfico 6.1: Curva de calibração obtida para o 1-feniletanol. Representação gráfica da área de 1-feniletanol em função da percentagem de 1-feniletanol.

Como se pode observar a partir do gráfico 6.1, existe uma relação linear entre a área e a percentagem de 1-feniletanol em toda a gama de trabalho.

6.2 Tabelas com os valores necessários para o cálculo das CMCs dos AASIs, tanto na forma de ácidos como na forma de ésteres.

Nas tabelas 6.3 e 6.4 estão representados, para cada um dos três AASIs 1, 2 e 3, um valor médio de três medidas de tensões superficiais e o correspondente desvio padrão (σ), para além do logaritmo das concentrações de surfactante.

Tabela 6.3: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 1 e AASI 2, necessários para a obtenção das CMCs.

<i>Brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 1)</i>			<i>Tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 2)</i>		
<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>	<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>
-4,54	65,4	0,208	-3,52	54,0	0,115
-3,54	54,8	0,231	-3,05	49,3	0,252
-3,24	51,4	0,252	-2,85	46,9	0,173
-2,82	48,7	0,115	-2,52	41,5	0,436
-2,54	48,8	0,100	-2,05	40,8	0,0577
-2,24	48,6	0,153	-1,85	40,6	0,265
-2,00	48,1	0,058			

Tabela 6.4: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 3, necessários para a obtenção das CMCs.

<i>Diocetil sulfosuccinato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 3)</i>		
<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>
-4,85	55,0	0,0577
-3,85	40,8	0,000
-3,55	34,8	0,200
-3,15	32,5	0,115
-2,85	31,1	0,153
-2,55	30,8	0,0577
-2,15	31,0	0,100
-1,85	30,0	0,100

Nas tabelas 6.5, 6.6 e 6.7 estão representados, para cada um dos cinco agentes acilantes surfactantes na forma de ésteres, um valor médio de três medidas de tensões superficiais e o correspondente desvio padrão (σ), para além do logaritmo das concentrações de surfactante.

Tabela 6.5: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 4 e AASI 5, necessários para a obtenção das CMCs.

<i>Brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 4)</i>			<i>Hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 5)</i>		
<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>	<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>
-3,57	51,6	1,18	-3,17	63,9	0,115
-3,27	47,3	1,40	-2,94	57,4	0,0577
-2,97	43,6	3,42	-2,80	52,3	0,115
-2,57	37,4	1,39	-2,64	51,5	0,100
-2,37	37,0	1,96	-2,17	50,9	0,0577
-2,18	35,7	1,04			
-2,03	35,6	1,31			
-1,88	34,9	0,987			

Tabela 6.6: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 6, necessários para a obtenção das CMCs.

<i>Tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 6)</i>		
<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>
-3,88	54,4	0,265
-3,06	46,4	0,100
-2,88	44,2	0,306
-2,58	41,2	0,252
-2,26	40,8	0,100
-2,06	40,7	0,0577

Tabela 6.7: Valores das tensões superficiais correspondentes às diferentes concentrações de AASI 8 e AASI 9, necessários para a obtenção das CMCs.

<i>Brometo de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 8)</i>			<i>Hexafluorofosfato de 1-(7-etoxi-7-oxohept-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 9)</i>		
<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>	<i>Log (C/mol.dm⁻³)</i>	<i>Tensão Superficial (mN/m)</i>	<i>σ (mN/m)</i>
-3,50	70,7	0,100	-3,52	56,0	0,0577
-2,50	66,9	0,0577	-3,07	53,3	0,361
-2,20	59,1	0,173	-2,52	48,9	0,265
-2,03	58,5	0,802	-2,07	46,7	0,289
-1,80	51,2	0,265	-1,89	43,6	0,0577
-1,50	43,2	0,400	-1,71	40,1	0,0577

6.3 Imagens obtidas ao microscópio das miniemulsões formadas utilizando diferentes álcoois secundários.

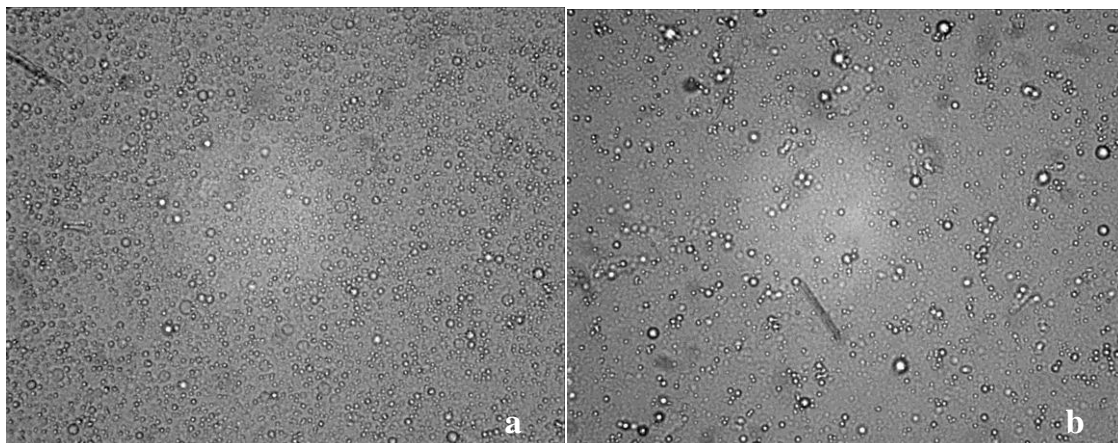


Figura 6.1: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (a) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (b), utilizando 2-pentanol como álcool secundário.

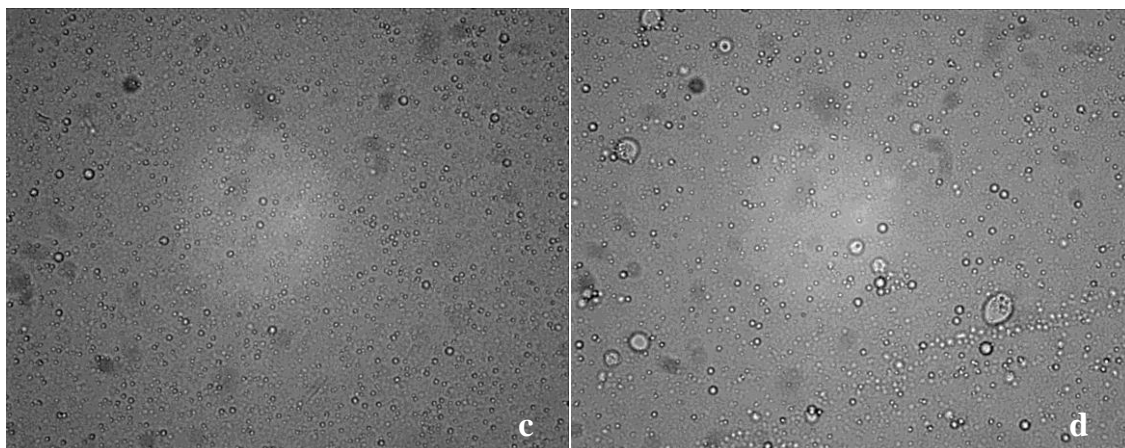


Figura 6.2: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (c) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (d), utilizando 2-heptanol como álcool secundário.

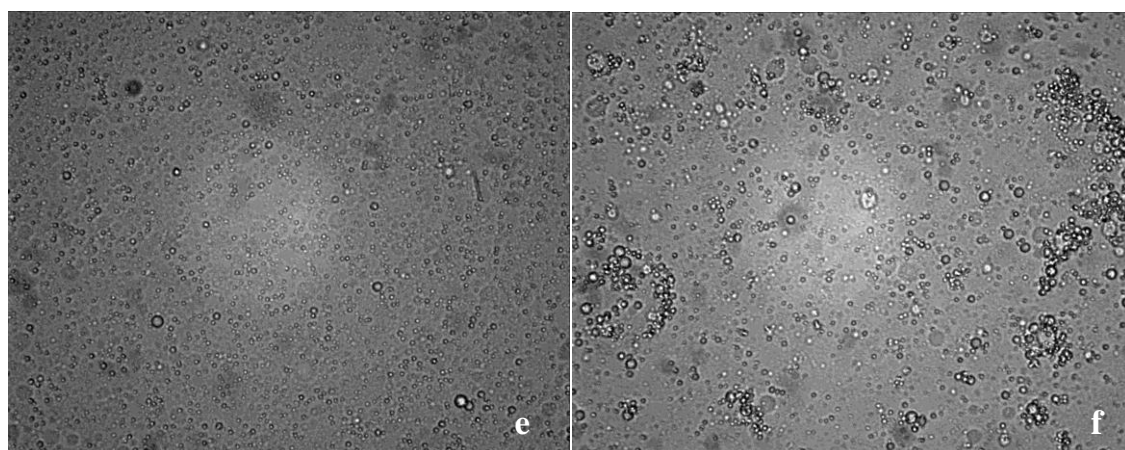


Figura 6.3: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (e) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (f), utilizando 2-octanol como álcool secundário.

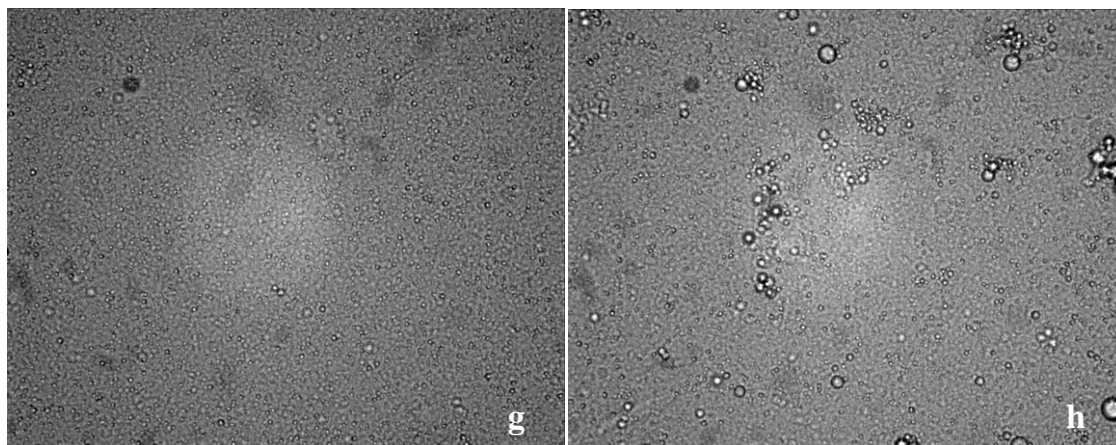


Figura 6.4: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (g) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (h), utilizando 2-decanol como álcool secundário.

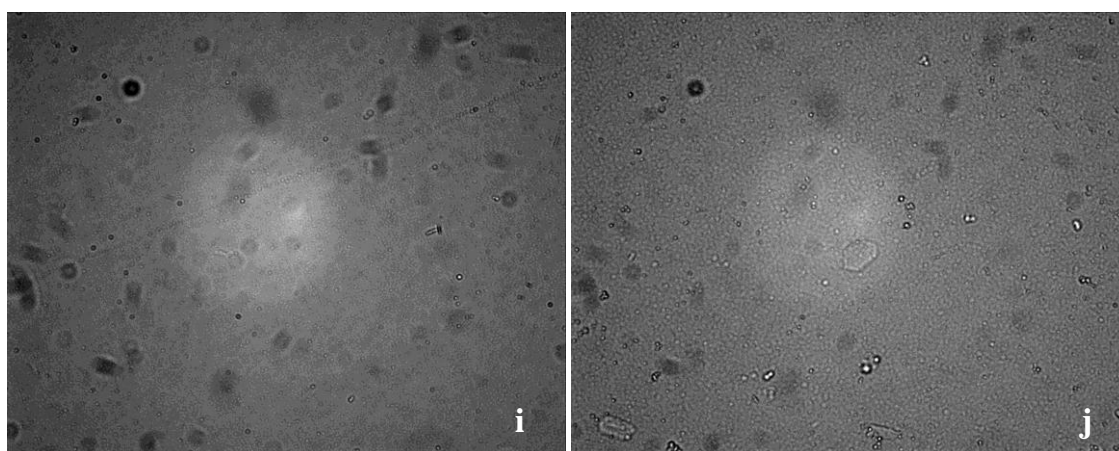


Figura 6.5: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x (i) e imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 500x 24h depois (j), utilizando 1-feniletanol como álcool secundário.

6.4 Imagens obtidas ao microscópio das miniemulsões formadas utilizando diferentes compostos que podem ser utilizados como co-surfactantes.

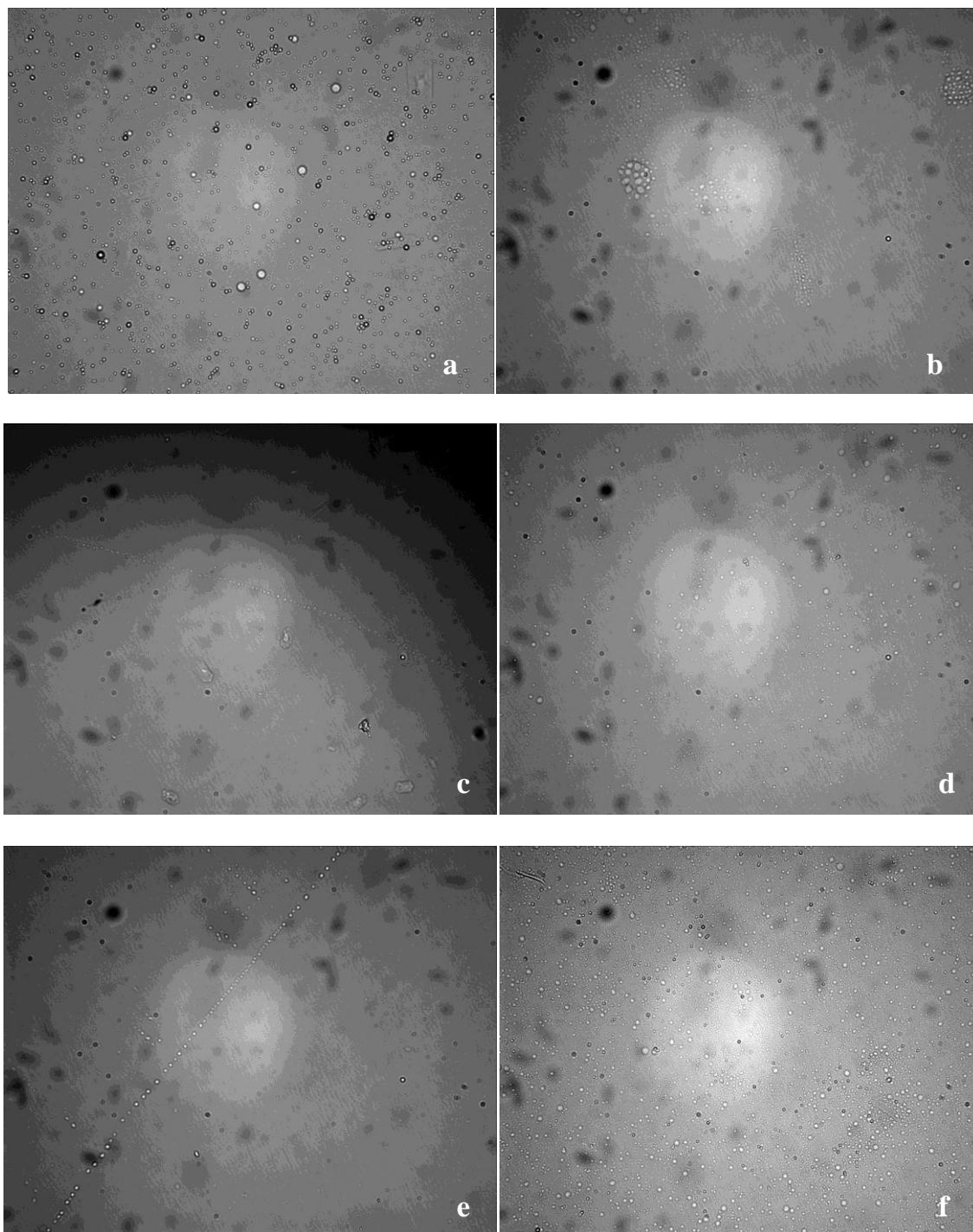


Figura 6.6: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 1% de n-hexadecano (a), de tolueno (b), de éter diisopropílico (c), de MTBE (d), de hexano (e) e de decano (f).

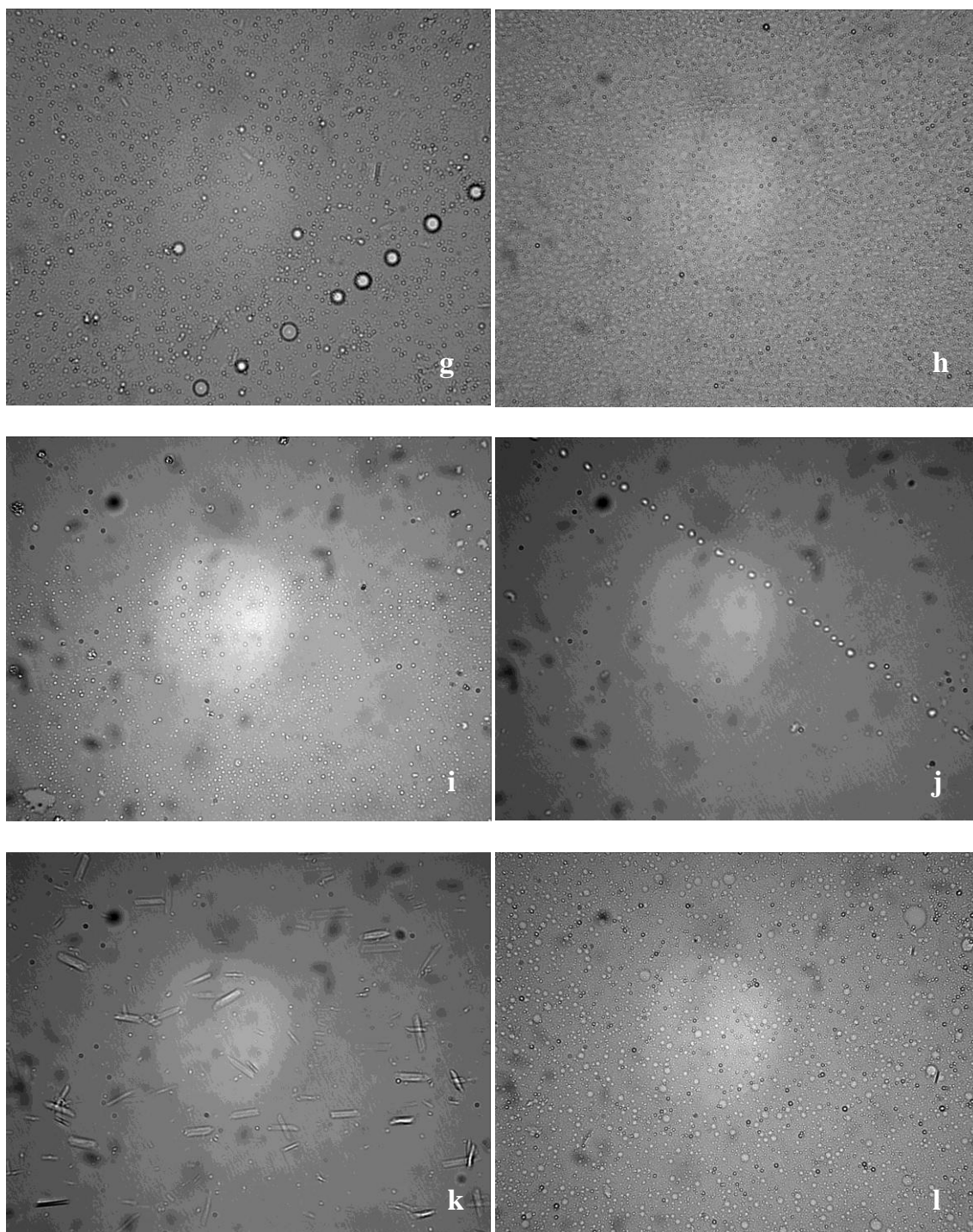


Figura 6.7: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 2% de n-hexadecano (g), de tolueno (h), de éter diisopropílico (i), de MTBE (j), de hexano (k) e de decano (l).

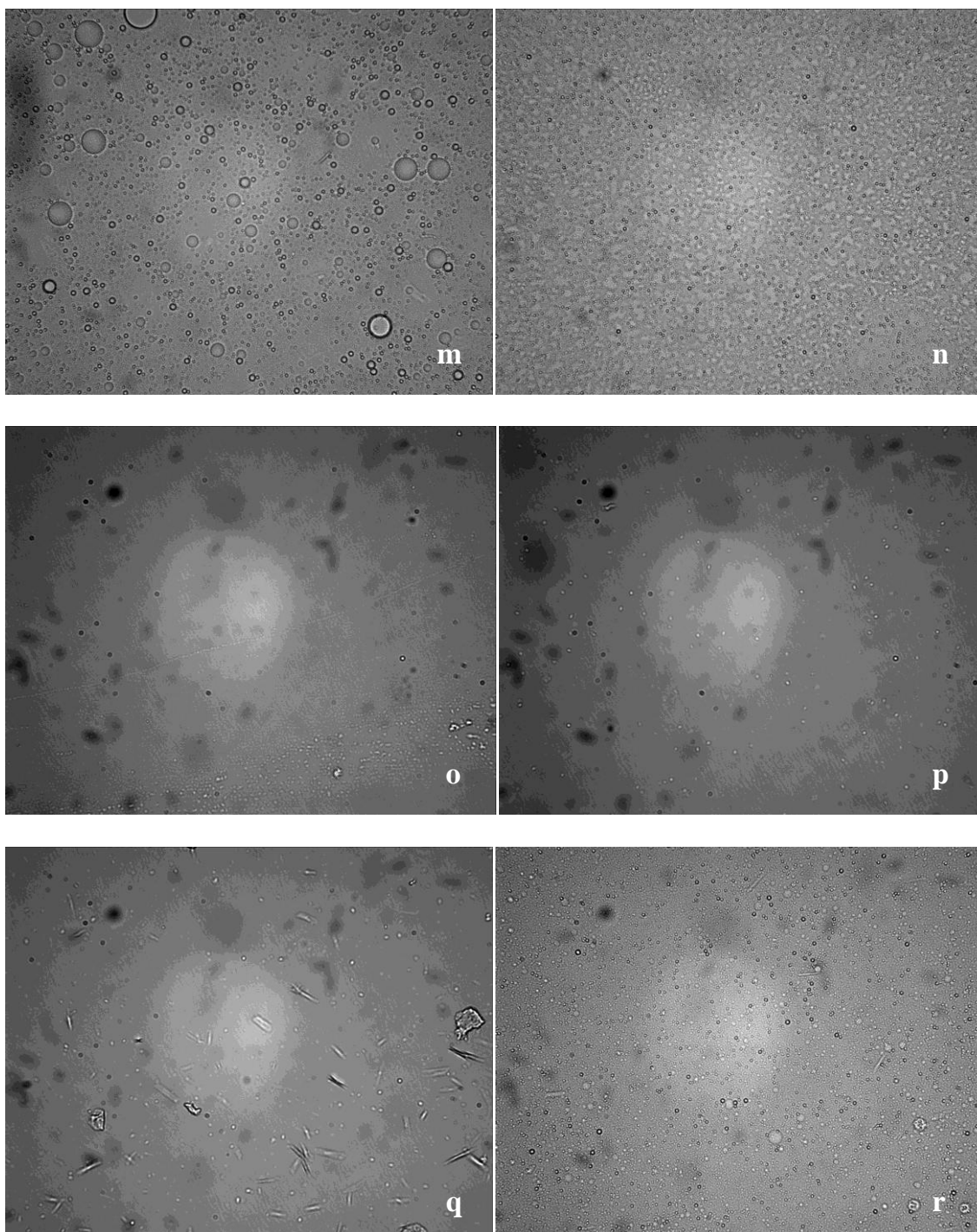


Figura 6.8: Imagem obtida por microscopia com uma ampliação de 200x utilizando 4% de n-hexadecano (m), de tolueno (n), de éter diisopropílico (o), de MTBE (p), de hexano (q) e de decano (r).

6.5 Tabela com os valores de conversão do álcool benzílico (álcool primário) e do 1-feniletanol (álcool secundário).

Tabela 6.8: Conversões do 1-feniletanol e do álcool benzílico em octanoato de 1-feniletilo e octanoato de benzilo, respectivamente, em reacções de esterificação enzimáticas. ^aDeterminada por HPLC.

Tempo (h)	Conversão ^a do 1-feniletanol (%)	Conversão ^a Álcool benzílico (%)
0,00	0,000	0,000
0,33	0,393	4,48
1,0	0,789	13,7
1,5	1,14	22,5
2,0	1,81	36,5
3,0	2,93	46,0
4,0	2,69	45,3
5,0	2,55	39,2
6,0	4,28	42,9
24	13,6	47,5
48	18,8	55,4
72	20,3	56,0
96	21,2	57,4

6.6 Tabela com os valores de conversão utilizando como agentes acilantes, o ácido octanóico e o ácido 11-bromoundecanóico, e utilizando o 1-feniletanol.

Tabela 6.9: Conversões do 1-feniletanol em octanoato de 1-feniletilo e em 11-bromoundecanoato de 1-feniletilo, em reacções de esterificação enzimática. ^aDeterminada por HPLC.

Tempo (h)	Conversão ^a do 1-feniletanol em octanoato de 1-feniletilo (%)	Conversão ^a do 1-feniletanol em 11-bromoundecanoato de 1-feniletilo (%)
0,00	0,000	0,000
0,33	0,393	0,714
1,0	0,789	2,27
1,5	1,14	3,45
2,0	1,81	4,38
3,0	2,93	6,28
4,0	2,69	7,48
5,0	2,55	8,27
6,0	4,28	9,31
24	13,6	17,5
48	18,8	19,6
72	20,3	
96	21,2	20,1

6.7 Tabela com os valores dos excessos enantioméricos obtidos pela resolução cinética enzimática do 1-feniletanol utilizando AASIs 1 e 2 em sistemas de miniemulsões.

Tabela 6.10: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando os AASIs 1 e 2, na presença da lipase PS “Amano”. ^a Determinado por GC.

	<i>Brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metilimidazólio (AASI 1)</i>	<i>Tetrafluoroborato de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metilimidazólio (AASI 2)</i>
Tempo (h)	ees^a (S) (%)	ees^a (S) (%)
0,00	1,87	0,736
0,33	1,73	
1,0	5,33	0,631
2,0	5,56	
4,0	3,08	1,58
6,0	4,13	
24	4,64	1,53
48	2,43	1,30
72	2,33	
96	1,9404	

Tabela 6.11: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o AASI 1 na presença de CALB L, sem utilizar Lutensol. ^a Determinado por GC.

	<i>Brometo de 1-(10-carboxi-decan-1-il)-3-metilimidazólio (AASI 1)</i>
Tempo (h)	ees^a (S) (%)
0,0	4,06
3,0	3,70
6	4,73
24	4,47
48	3,37

6.8 Tabela com os valores dos excessos enantioméricos obtidos pela resolução cinética enzimática do 1-feniletanol utilizando AASIs 4, 5, 6 e 7 em sistemas de miniemulsões.

Tabela 6.12: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o AASI 4 e 5 na presença de CALB L. ^a Determinado por GC.

	<i>Brometo de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 4)</i>	<i>Hexafluorofosfato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 5)</i>
Tempo (h)	ees^a (S) (%)	ees^a (S) (%)
0,0	1,62	4,42
1,0	1,82	6,72
3,0	3,46	8,43
6,0		8,72
24	14,3	12,9
48	6,67	14,0
72	7,50	7,50

Tabela 6.13: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando os AASIs 6 e 7 na presença de CALB L. ^a Determinado por GC.

	<i>Tetrafluoroborato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 6)</i>	<i>Diocil sulfossuccinato de 1-(11-etoxi-11-oxoundec-1-il)-3-metil-imidazólio (AASI 7)</i>
Tempo (h)	ees^a (S) (%)	ees^a (S) (%)
0,0	3,75	2,39
1,0	6,33	8,51
3,0	9,16	7,93
6,0	10,1	8,36
24	6,64	3,10
48	6,22	6,95
72	7,77	6,16

6.9 Tabela com os valores dos excessos enantioméricos obtidos pela resolução cinética enzimática do 1-feniletanol utilizando ácido octanóico e diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” em sistemas de miniemulsões.

Tabela 6.14: Resultados obtidos da RCE de 1-feniletanol utilizando o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg). ^aDeterminado por GC.

	<i>Lipase PS 20mg</i>	<i>Lipase PS 40mg</i>	<i>Lipase PS 60mg</i>
Tempo (h)	ees^a (S) (%)	ees^a (S) (%)	ees^a (S) (%)
0,000	1,36	1,16	2,26
0,330	4,06	3,63	5,18
1,00	5,22	3,00	2,73
3,00	6,89	7,99	11,4
5,00	13,9	11,5	24,2
24,0	30,4	38,2	34,8
48,0	38,2	41,1	39,2
72,0	39,1	41,3	40,2
96,0	39,6	43,2	42,2
144	42,9	43,1	41,2
168	43,3	43,8	41,7
192	40,5	43,2	42,3

6.10 Tabela com os valores das áreas do etiloctanoato e do ácido octanóico importantes para a análise da reacção de hidrólise do etiloctanoato.

Tabela 6.15: Resultados obtidos da reacção de hidrólise do etiloctanoato, na presença de Lipase PS “Amano”. ^aDeterminada por GC.

Tempo (h)	Área Etiloctanoato^a	Área Ácido Octanóico^a	Razão Etiloctanoato/Ácido Octanóico
0,000	875671	3549	247
0,330	886160	71807	12,3
1,00	934899	74356	12,6
3,00	790736	65731	12,0
5,00	747204	59380	12,6
24,0	757471	109406	6,92
48,0	673272	81587	8,25
72,0	709139	98671	7,19
96,0	630856	53119	11,9
168	497396	180134	2,76
192	560897	230754	2,43

6.11 Tabela com os valores dos excessos enantioméricos obtidos pela resolução cinética enzimática do sulcatol utilizando ácido octanóico e diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” em sistemas de miniemulsões.

Tabela 6.16: Resultados obtidos da RCE de sulcatol utilizando o ácido octanóico, na presença de diferentes quantidades de Lipase PS “Amano” (20mg; 40mg; 60mg).^aDeterminado por GC.

	<i>Lipase PS 20mg</i>	<i>Lipase PS 40mg</i>	<i>Lipase PS 60mg</i>
Tempo (h)	ee^a (S) (%)	ee^a (S) (%)	ee^a (S) (%)
0,000	3,85	3,09	3,44
0,330	1,63	3,39	3,08
1,00	3,22	3,50	4,84
3,00	2,78	4,52	5,48
5,00	2,39	4,76	6,40
24,0	6,87	12,1	20,0
48,0	11,9	18,0	33,4
72,0	15,8	23,9	44,1
96,0	19,5	30,1	53,6
144	27,2		
168	29,9	41,1	74,3
192	33,8	46,5	76,9

6.12 Curva teórica com três parâmetros, excesso enantiomérico de substrato e de produto e conversão, da resolução cinética enzimática de sulcatol.

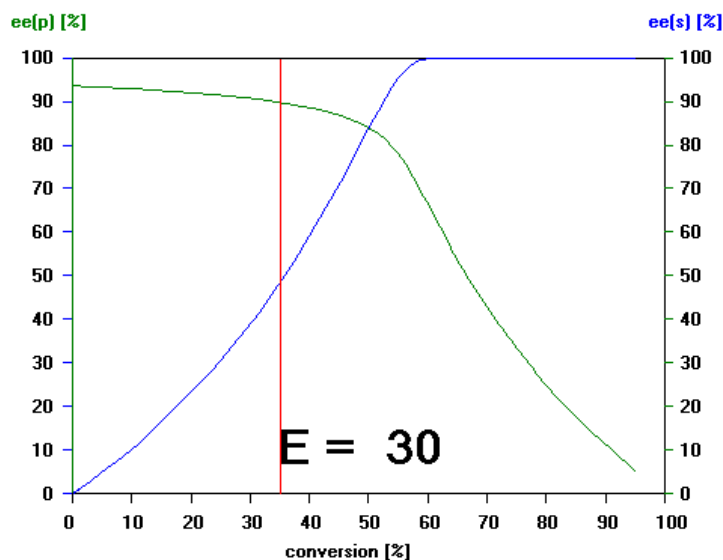


Figura 6.9: Representação de uma curva teórica com três parâmetros, ees, eep e conversão, da resolução RCE do sulcatol com ácido octanóico, na presença de Lipase PS “Amano”.

6.13 Tabela com os valores dos excessos enantioméricos obtidos pela resolução cinética enzimática do sulcatol utilizando diferentes quantidades de ácido octanóico em sistemas de miniemulsões.

Tabela 6.17: Resultados obtidos da RCE de sulcatol utilizando duas concentrações diferentes de ácido octanóico (1eq e 3eq), na presença de 20mg de Lipase PS “Amano”.^aDeterminado por GC.

	Ácido octanóico	
	1 equivalente	3 equivalentes
Tempo (h)	ee ^a (S) (%)	ee ^a (S) (%)
0,000	3,85	-0,280
0,330	1,63	-0,919
1,00	3,22	0,526
3,00	2,78	-6,61
5,00	2,39	-4,54
24,0	6,87	-0,728
48,0	11,9	1,70
72,0	15,8	7,12
96,0	19,5	5,19
144	27,2	
168	29,9	
192	33,8	29,3

6.14 Espectro de ¹H RMN com os picos correspondentes ao sulcatol e ao (R)-octanoato de 1,5-dimetil-hex-4-enilo.

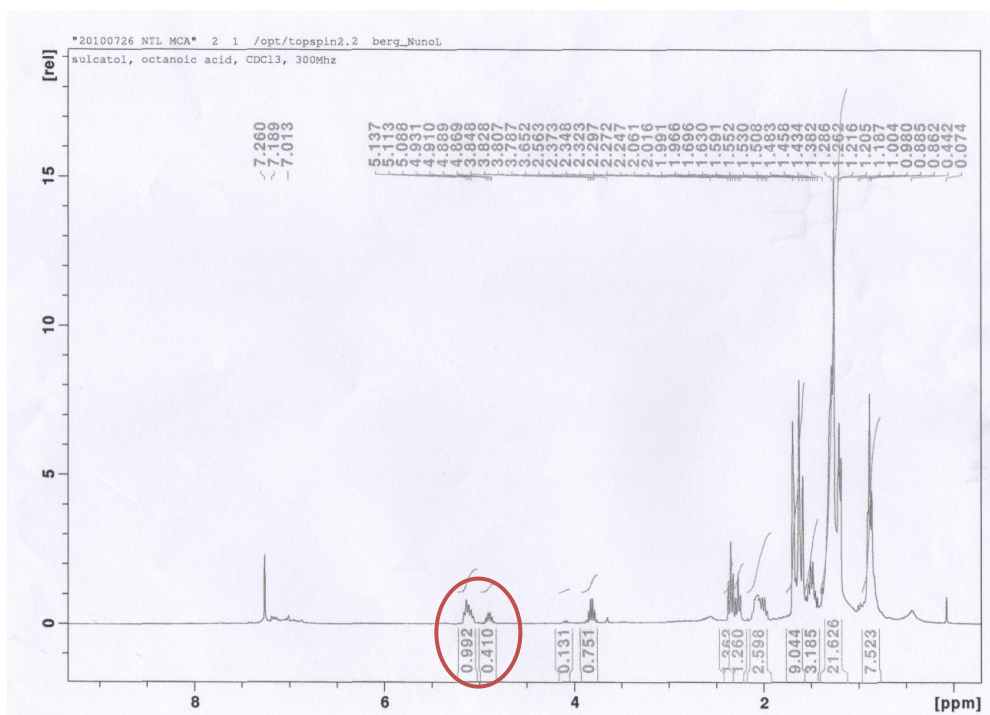


Figura 6.10: Representação do espectro de ¹H RMN com os picos correspondentes ao sulcatol e ao R-octanoato de 1.5-dimetil-hex-4-enilo.